



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 545**

21 Número de solicitud: 201030096

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/07** (2010.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **26.01.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2011**

Fecha de la concesión: **04.04.2012**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**08.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **18.04.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**18.04.2012**

73 Titular/es:

**Universidade de Santiago de Compostela  
Edificio CACTUS-CITT Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Nogueira Álvarez, Montserrat;  
Salgado Castro, Francisco Javier;  
Arias Crespo, Pilar;  
Pérez Díaz, Amparo y  
Martínez Villanueva, Nora**

74 Agente/Representante:  
**Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método para identificar y purificar células T reguladoras naturales humanas (nTreg).**

57 Resumen:

Método para identificar y purificar células T reguladoras naturales humanas (nTreg).

Método para aislar o purificar células nTreg de una muestra biológica, preferiblemente de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmune. Además la invención también se refiere a un kit para aislar o purificar células nTreg de una muestra biológica.

ES 2 363 545 B2

## DESCRIPCIÓN

Método para identificar y purificar células T reguladoras naturales humanas (nTreg).

5 La presente invención se encuadra en el campo de la inmunología. Concretamente, la invención se refiere a un método y un kit para aislar o purificar células nTreg de una muestra biológica, preferiblemente de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmune.

**Estado de la técnica anterior**

10 Las células T reguladoras naturales CD4+CD25+, también llamadas células nTreg, suponen el 5-10% de los linfocitos T CD4+ de sangre periférica. Su función es inhibir la activación y las funciones efectoras (proliferación, producción de citoquinas y anticuerpos, etc) de otras células del sistema inmunológico, las llamadas células “efectoras”, que son las que llevan a cabo la respuesta inmunológica (por ejemplo, otros linfocitos T, pero también linfocitos B, células NK y NKT, células presentadoras de antígenos, etc).

15 Inicialmente se pensaba que las células nTreg controlaban exclusivamente las respuestas a los antígenos propios (autoantígenos) por parte de las células efectoras, y que por eso la eliminación de esta subpoblación especializada de linfocitos generaba el desarrollo de enfermedades autoinmunes sistémicas. Sin embargo, pronto se supo que también suprimían respuestas a antígenos ajenos (aloantígenos) o tumorales, controlando de este modo el desencadenamiento de respuestas inmunológicas excesivas (en el caso de infecciones víricas o bacterianas, por ejemplo) o impidiendo la generación de respuestas inmunológicas (como, por ejemplo, en el caso del cáncer o el sida).

20 Existe, por tanto, un interés creciente en investigar el papel de las células nTreg en el contexto de ciertas enfermedades (infecciones, enfermedades autoinmunes, cáncer o sida) así como en trasplantes. En este sentido, las células nTreg podrían ser empleadas en terapias inmunológicas; por ejemplo haciendo uso de su actividad supresora en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias o en trasplantes, o bien suprimiendo dicha función en el tratamiento del cáncer o el sida. Así, las células nTreg podrían ser aisladas de muestras procedentes de pacientes con distintas enfermedades (artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, sida, linfoma agudo de células T) para estudiar su funcionalidad, conocer su número y proporción con respecto a otros linfocitos, etc, o bien de manera aún más aplicada en terapias inmunológicas personalizadas: por ejemplo, purificando de la sangre del paciente las células nTreg, expandiendo esa población de linfocitos *in vitro*, y reintroduciéndolas nuevamente en el mismo individuo con el fin de controlar una enfermedad autoinmune o evitar que el rechazo de un órgano transplantado, por ejemplo.

25 Para la identificación y purificación de las células nTreg es imprescindible su caracterización fenotípica mediante marcadores moleculares que pueden estar bien presentes o ausentes, o al menos en mayor o menor medida, en estos linfocitos en comparación con las células T efectoras. Dichos marcadores moleculares permiten delimitar, dentro de los linfocitos T CD4+, cuáles son células nTreg y cuáles “efectores”, y así visualizarlos, contabilizarlos o evaluar su presencia en distintos tejidos mediante citometría o microscopía por ejemplo, o bien purificarlos mediante FACS o medios magnéticos para un uso posterior, como por ejemplo en trasplantes autólogos clínicos.

30 Las células nTreg humanas expresan de forma constitutiva en su superficie proteínas como CD4, CD25/IL-2R $\alpha$ , CD27, LAG-3, galectina-1, CD38, neuropilina/RNP, OX-40L, CD5, TNFR2, TGF $\beta$ R1, GPR83, CD45RO, CTLA-4, HLA-DR o GITR. Este gran número de marcadores genera una falsa sensación de certeza a la hora de delimitar y diferenciar plenamente la población de células nTreg de los linfocitos T “efectores”. Sin embargo, los marcadores descritos hasta la fecha presentan varios problemas. En primer lugar, debido a la heterogeneidad existente en la población de células nTreg, estos marcadores no están presentes en el 100% de las células nTreg. En segundo lugar, estos marcadores no son exclusivos de este linaje celular. Así, pueden estar ausentes en células T “efectoras” en reposo, pero expresarse en células “efectoras” activadas o de memoria; o por el contrario, pueden ser expresados por células T “efectoras” en reposo, pero perder dicha expresión cuando se convierten en células activadas o de memoria.

35 La mayoría de las células nTreg expresan constitutiva y fuertemente CD25 y esta expresión no se pierde con la activación de las células nTreg. En cambio, las células T “efectoras”, inicialmente CD4+CD25- cuando están en reposo (una característica que precisamente permite distinguir las de las células nTreg CD4+CD25+) aumentan la expresión de CD25 cuando se activan (Baecher-Allan C. *et al.* J. Immunol. 2001, 167: 1245). El mismo problema sucede con GITR (McHugh R.S. *et al.* Immunity 2002, 16: 311), HLA-DR (Salgado F.J. *et al.* Immunol. Cell. Biol. 2002, 80: 138) o CTLA-4/CD152 (Perkins D. *et al.* J. Immunol. 1996, 156: 4154), por ejemplo.

40 La nula o baja presencia de CD127 en la superficie celular ha sido vinculada a la existencia de un fenotipo nTreg en los linfocitos de donantes sanos (Liu W. *et al.* J. Exp. Med. 2006, 203: 1701; Seddiki N. J. Exp. Med. 2006, 203: 1693; Banham A.H. TRENDS Immunol 2006, 27: 541; WO 2007140472; WO 2007140472). Sin embargo, la existencia de inflamación, por ejemplo, en pacientes con artritis reumatoide (Aerts N.E. *et al.* Cell. Immunol. 2008, 251: 109), hace aparecer células T CD4+CD25+CD127- que no son células nTreg, sino células T efectoras activadas.

45 FoxP3 representa un marcador más ligado a un fenotipo de célula reguladora, y su detección en células permeabilizadas mediante anticuerpos monoclonales anti-FoxP3 es empleada por muchos investigadores para la identificación de estas células *in vivo*. Sin embargo, el hecho de que FoxP3 sea un marcador intracelular hace que no pueda ser empleado en protocolos de purificación de células nTreg sin “matar” previamente a los linfocitos que queremos “eti-

quetar” debido a la necesidad de permeabilizar las células. Pero además, este marcador no es absolutamente específico de células nTreg, ya que trabajos bastante recientes indican que, al menos en humanos, la activación de células T “efectoras” CD4+CD25- induce una expresión transitoria de FoxP3 (Tran D.Q. *et al.* Blood 2007, 110: 2983; Ziegler S.F. *et al.* Eur. J. Immunol 2007, 37: 21; Roncarolo M.-G y Gregori S. Eur. J. Immunol. 2008, 38: 901).

5 CD49d (cadena  $\alpha$  de la integrina VLA-4) se expresa en la mayoría de las células efectoras pro-inflamatorias productoras de IFN $\gamma$  o IL-17, pero no en las nTreg (Kleinewietfeld M *et al.* Blood 2009, 113: 827; WO2009047003). Sin embargo, aunque se ha demostrado que el fenotipo CD4+CD25+CD49d- permite identificar a las células nTreg cuando la población de linfocitos procede de un individuo sano, no se ha comprobado si CD49d permitiría caracterizar o purificar las células nTreg en el caso de linfocitos procedentes de pacientes con enfermedades inflamatorias o cáncer.

Recientemente, se ha propuesto la utilización de CD39 como marcador de nTreg humanas. Empleando linfocitos procedentes de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, se ha demostrado su eficacia en la identificación de nTregs en un contexto de activación celular o situación inflamatoria. Sin embargo, aunque las células CD4+CD39+ expresan bajos niveles de CD127, éstas sólo contienen un 50-70% de células FoxP3+ en individuos sanos, o un 50-90% de células FoxP3+ en pacientes con carcinoma. (Mandapathil *et al.* J. Immunol. Methods 2009, 346: 55). De esta manera, dentro de los linfocitos CD4+CD39+ existen células que expresan nulos o bajos niveles de FoxP3 y que pueden ser linfocitos T efectoras.

Por tanto, la falta de especificidad de la que adolecen los marcadores de descritos hasta la fecha, complica la identificación y purificación de células nTreg, especialmente en aquellas muestras procedentes de individuos con enfermedades inflamatorias. En la mayoría de los protocolos (Miltenyi Biotech, BD Biosciences, Invitrogen) la purificación de células nTreg mediante sistemas magnéticos se basa en los marcadores CD4 y CD25, y se hace mediante dos pasos. El primero de ellos es un proceso de selección negativa en el que se eliminan las células T que no son CD4+ (eritrocitos, plaquetas, linfocitos T CD8+, linfocitos T  $\gamma\delta$ , linfocitos B, células NK, macrófagos, células dendríticas, granulocitos) mediante una mezcla de anticuerpos biotinilados (por ejemplo anti-CD8, anti-CD11b/Mac1, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD41a, anti-CD56, anti-CD123, anti-CD235a y  $\gamma\delta$ TCR), que son reconocidos por microesferas recubiertas con un anticuerpo anti-biotina. En algunos protocolos (Miltenyi) se añade a la mezcla de anticuerpos anti-CD127 biotinilado, para la eliminación de células CD127+ (no células nTreg). Las células que no son T CD4+, marcadas con las microesferas, son retenidas por el efecto de un imán; mientras, las células CD4+ no son retenidas por la columna y son recogidas en un tubo. El segundo paso es un proceso de selección positiva en el que las células no retenidas en el paso anterior, con un fenotipo CD4+, son marcadas directamente con microesferas recubiertas con un anticuerpo anti-CD25, o bien de manera indirecta con microesferas anti-APC que reconocen toda aquella célula nTreg etiquetada con anticuerpos anti-CD25-APC. En cualquiera de los dos casos, las células son luego pasadas a través de un sistema de separación en el que las nTreg CD4+CD25+ son retenidas por efecto del imán, al contrario que las células CD4+CD25-. Cuando la influencia del imán se elimina en un paso posterior las células nTreg son obtenidas puras.

Recientemente, ha hecho aparición en el mercado un nuevo protocolo de purificación magnética de nTregs (Miltenyi Biotec) basado en el uso del marcador CD49d (Kleinewietfeld M *et al.* Blood 2009, 113: 827; WO2009047003). Este protocolo también consta de dos pasos. El primero de ellos es un proceso de selección negativa en el que las células CD8+ y CD49d+ son marcadas magnéticamente con microesferas recubiertas de anticuerpos anti-CD8 y anti-CD49d. Los linfocitos CD8+CD49d+ son retenidos en la columna por el efecto del imán, mientras que las células CD4+CD49d- pasan a través de la columna sin ser retenidas, siendo posteriormente recogidas en un tubo para ser empleadas en el paso siguiente. En el segundo paso, de selección positiva, las células CD49d- son marcadas con microesferas recubiertas de anti-CD25. Al pasar por la columna las células nTreg CD4+CD25+ son retenidas gracias al efecto del imán, mientras que las CD4+CD25- atraviesan libremente la columna. Finalmente, las células nTreg son eluidas y recogidas en un tubo para su uso posterior.

## 50 Explicación de la invención

La presente invención proporciona un método y un kit para aislar o purificar células nTreg de una muestra biológica, preferiblemente, de un sujeto con una enfermedad inflamatoria o autoinmune.

55 Tanto en investigación como en clínica existe gran interés en purificar células nTreg de manera fiable. Para ello es imprescindible disponer de marcadores moleculares que permitan distinguir las células nTreg de linfocitos T efectoras. Sin embargo, los marcadores moleculares descritos en el estado de la técnica no permiten realizar esta distinción cuando se trata de linfocitos T efectoras activados, tal y como sucede en muestras de sujetos con enfermedades inflamatorias o autoinmunes. Por tanto, existe la necesidad de disponer de marcadores moleculares que permitan discriminar las células nTreg de los linfocitos T efectoras activados. Es además deseable que dichos marcadores sean de selección negativa, de manera que las células nTreg puedan ser purificadas libres de marcaje, tal y como se requiere en terapia celular.

65 Como se muestra en los ejemplos de la presente invención, los bajos o nulos niveles de CD26 presentes en la superficie celular de las células nTreg humanas en comparación con los linfocitos T efectoras activados, permite diferenciar estas dos poblaciones. A diferencia de otros marcadores de selección negativa descritos en el estado de la técnica, los niveles de CD26 aumentan en linfocitos T activados. Las células nTreg pueden ser así purificadas mediante este marcador con una elevada pureza independientemente del grado de activación de la población de linfocitos de

## ES 2 363 545 B2

partida. La presente invención resuelve así el problema de la contaminación potencial con linfocitos T efectores que presentan los protocolos actuales, especialmente cuando se trata de analizar muestras de pacientes con enfermedades inflamatorias.

5 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para aislar o purificar nTreg de una muestra biológica aislada (de aquí en adelante, método primero de la invención), que comprende las siguientes etapas:

a) tratar dicha muestra biológica con un anticuerpo anti-CD26, y con al menos un anticuerpo seleccionado de la lista que comprende:

10 i) un anticuerpo anti-CD25,

ii) un anticuerpo anti-CD127,

15 iii) un anticuerpo anti-CD49d,

o cualquiera de sus combinaciones, y

b) separar las células nTreg.

20

La expresión “tratar la muestra biológica”, tal y como se utiliza en la presente descripción, implica que las células que comprenden la muestra biológica entran en contacto físico con los anticuerpos, de manera que los anticuerpos puedan interactuar con las células que expresan las moléculas reconocidas específicamente por dichos anticuerpos.

25

La expresión “separar”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a extraer mediante medios físicos un tipo particular de células de una población formada por al menos dos tipos celulares distintos; por ejemplo, extraer las células nTreg de células T efectoras, permitiendo así obtener una población enriquecida en células nTreg. La separación puede tener lugar en una o más etapas, que pueden llevarse a cabo de manera consecutiva.

30

Las etapas (a) y (b) del método primero de la invención pueden llevarse a cabo simultáneamente. Por otra parte, las etapas (a) y (b) pueden llevarse a cabo repetidas veces, ya sea simultáneamente ya sea de manera independiente. De esta manera, se puede repetir la etapa (a) un número indeterminado de veces y/o la etapa (b) un número indeterminado de veces, no teniendo que coincidir el número de repeticiones de la etapa (a) con el número de repeticiones de la etapa (b). Puede, por ejemplo, realizarse una primera etapa (a) y una primera etapa (b), y a continuación, puede realizarse una segunda etapa (a) y una segunda etapa (b), y así sucesivamente, con terceras, cuartas, quintas, etc. etapas (a) y (b). También es posible, por ejemplo, realizar varias etapas (a) y a continuación una o más etapas (b).

35

En una realización preferida del método primero de la invención, los pasos (a) y (b) se llevan a cabo simultáneamente. La ventaja de llevar a cabo las etapas (a) y (b) de manera simultánea es que el aislamiento de las células nTreg es menos laborioso, más simple, rápido y barato. La ventaja de llevar a cabo las etapas (a) y (b) repetidas veces es que se pueden usar para la separación diferentes anticuerpos que permiten tanto la selección positiva como la selección negativa de las nTreg.

40

La expresión “selección positiva”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a que las células deseadas, por ejemplo, las nTreg, son eliminadas de la población inicial marcando y capturando dichas células, mientras que las no deseadas quedan libres de marcaje. Ejemplos de anticuerpos que permiten la selección positiva de las células nTreg, son por ejemplo, pero sin limitarnos, el anticuerpo anti-CD4 o el anticuerpo anti-CD25.

45

La expresión “selección negativa”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que las células no deseadas son eliminadas del repertorio de células mediante su marcaje y captura, mientras que las deseadas, por ejemplo las células nTreg, quedan libres de marcaje. Ejemplos de anticuerpos que permiten la selección negativa de las células nTreg, son por ejemplo, pero sin limitarnos, el anticuerpo anti-CD26, el anticuerpo anti-CD127 o el anticuerpo anti-CD49d.

50

55

Cuando en la etapa (a) se emplea un anticuerpo que permite la selección negativa de las células nTreg, en la etapa (b) se lleva a cabo la eliminación de la muestra biológica de las células no deseadas que expresan la molécula reconocida específicamente por dicho anticuerpo, quedando las células deseadas, por ejemplo las células nTreg, libres de marcaje. Por tanto, en una realización preferida, en la etapa (b) del método primero de la invención se lleva a cabo la eliminación de la muestra biológica de las células:

60

- CD26+ cuando en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26; o

- CD127+ cuando en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD127, o

65

- CD49d+ cuando en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD49d.

## ES 2 363 545 B2

Tal y como se demuestra en los ejemplos, el fenotipo CD25+CD26- permite diferenciar la población de células nTreg de la población de células T efectoras CD25+/CD26+, independientemente del grado de activación de la población de células T de partida.

5 Por tanto, en una realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26 y con un anticuerpo anti-CD25. En una realización más preferida, el método primero de la invención, comprende:

- 10 - una primera etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD26,
- una primera etapa (b), en la que se separan las células CD26-, mediante la eliminación de las células CD26+ de la muestra biológica;
- 15 - una segunda etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD25, y
- una segunda etapa (b), en la que se separan las células nTreg CD25+CD26-.

20 La interacción de un anticuerpo con la molécula de la superficie de las células a la que este anticuerpo reconoce específicamente puede inducir un proceso de señalización intracelular no deseada, o la activación del sistema del complemento en el caso de que estas células sean introducidas en un individuo. Es decir, aislar las células nTreg empleando únicamente procesos de selección negativa tiene la ventaja de que no se desencadenan estos procesos.

25 Por este motivo, en otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD26 y con otro u otros anticuerpos adicionales que también permiten la selección negativa de las células nTreg. La muestra biológica puede tratarse, por ejemplo, de manera secuencial con el anticuerpo anti-CD26 y con otro u otros anticuerpos que permiten la selección negativa, como por ejemplo CD127 o CD49d, de manera que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo repetidas veces. La muestra biológica también puede tratarse con estos anticuerpos de selección negativa de manera simultánea, de modo que el método es menos laborioso y más simple, rápido y barato.

30 En otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26 y con un anticuerpo anti-CD127. Mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD26 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD26+ de la muestra biológica y mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD127 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD127+ de la muestra biológica; de esta manera se aíslan las células nTreg CD127-CD26-. En una realización más preferida, en la etapa (a) la muestra biológica se trata simultáneamente con un anticuerpo anti-CD26 y con un anticuerpo anti-CD127.

40 En otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26 y con un anticuerpo anti-CD49d. Mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD26 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD26+ de la muestra biológica y mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD49d en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD49d+ de la muestra biológica; de esta manera se aíslan las células nTreg CD49d-CD26-. En una realización más preferida, en la etapa (a) la muestra biológica se trata simultáneamente con un anticuerpo anti-CD26 y con un anticuerpo anti-CD49d.

50 En otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26, con un anticuerpo anti-CD127 y con un anticuerpo anti-CD49d. Mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD26 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD26+ de la muestra biológica, mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD127 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD127+ de la muestra biológica y mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD49d en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD49d+ de la muestra biológica; de esta manera se aíslan las células nTreg CD127-CD49d-CD26-. En una realización más preferida, en la etapa (a) la muestra biológica se trata simultáneamente con un anticuerpo anti-CD26, un anticuerpo anti-CD127 y con un anticuerpo anti-CD49d.

60 La ventaja de combinar anticuerpos que permiten la selección positiva y anticuerpos que permiten la selección negativa de las células nTreg es que se aísla una población de células nTreg más pura. Por tanto, en una realización preferida, en la etapa (a) se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD26 y con otro u otros anticuerpos adicionales que también permiten la selección negativa de las nTreg, como por ejemplo CD127 o CD49d, y además con otro u otros anticuerpos adicionales que permiten la selección positiva de las células nTreg, como por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25.

65

## ES 2 363 545 B2

En otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26, con un anticuerpo anti-CD25 y con un anticuerpo anti-CD127. En una realización más preferida, el método primero de la invención, comprende:

- 5 - una primera etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD26 y un anticuerpo anti-CD127,
- una primera etapa (b), en la que se separan las células nTreg CD127-CD26-, mediante la eliminación de las células CD127+ y de las células CD26+ de la muestra biológica;
- 10 - una segunda etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD25, y
- una segunda etapa (b), en la que se separan las células nTreg CD25+CD127-CD26-.

15 En otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26, con un anticuerpo anti-CD25 y con un anticuerpo anti-CD49d. En una realización más preferida, el método primero de la invención, comprende:

- 20 - una primera etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD26 y un anticuerpo anti-CD49d,
- una primera etapa (b), en la que se separan las células nTreg CD49d-CD26-, mediante la eliminación de las células CD49d+ y de las células CD26+ de la muestra biológica;
- 25 - una segunda etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD25, y
- una segunda etapa (b), en la que se separan las células nTreg CD25+CD49d-CD26-.

30 En otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD26, con un anticuerpo anti-CD25, con un anticuerpo anti-CD127 y con un anticuerpo anti-CD49d. En una realización más preferida, el método primero de la invención, comprende:

- 35 - una primera etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD26, un anticuerpo anti-CD127 y un anticuerpo anti-CD49d,
- una primera etapa (b), en la que se separan las células nTreg CD127-CD49d-CD26-, mediante la eliminación de las células CD127+, de las células CD49d+ y de las células CD26+ de la muestra biológica;
- 40 - una segunda etapa (a), en la que se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD25, y
- una segunda etapa (b), en la que se separan las células nTreg CD25+CD127-CD49d-CD26-.

45 Además, la etapa (b) del método primero de la invención puede comprender la eliminación de la muestra biológica de las células que no son T CD4+. La ventaja de eliminar estas células que no son T CD4+ de la muestra es que la pureza de la población de células nTreg aislada es mayor. Por tanto, en una realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (b) se eliminan de la muestra biológica las células que no son T CD4+.

50 Las células que no son T CD4+ pueden ser eliminadas de la muestra mediante selección positiva de las células CD4+. Por tanto, en una realización preferida, en la etapa (a) del método primero de la invención se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD4; de manera que en la etapa (b) se lleva a cabo la eliminación de las células que no son T CD4+ y la captura (separación) de las células nTreg, que son CD4+.

55 Por otra parte, las células que no son T CD4+ también pueden ser eliminadas de la muestra biológica mediante selección negativa, empleando para ello uno o más anticuerpos que reconocen específicamente las células T que no son CD4+. Por tanto, en una realización preferida, en la etapa (a) del método primero de la invención se trata la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce una molécula presente en las células que no son T CD4+. En una realización más preferida en la etapa (a) del método primero de la invención se trata la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce una molécula presente en las células que no son T CD4+ seleccionado de la lista que comprende los siguientes anticuerpos: anti-CD8, anti-CD11 b/Mac1, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD41a, anti-CD56, anti-CD123, anti-CD235a y anti- $\gamma\delta$ TCR, o con cualquiera de sus combinaciones.

65 Por ejemplo, en otra realización preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD8, con un anticuerpo anti-CD26, con un anticuerpo anti-CD127 y con un anticuerpo anti-CD49d. Mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD8 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de algunas células T y NK que son CD8+ de la muestra biológica, mediante el tratamiento con el anticuerpo

anti-CD26 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD26+ de la muestra biológica, mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD127 en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD127+ de la muestra biológica y mediante el tratamiento con el anticuerpo anti-CD49d en la etapa (a) se lleva a cabo la eliminación en la etapa (b) de las células CD49d+ de la muestra biológica (linfocitos T y B, así como débilmente en macrófagos); de esta manera se aíslan las células nTreg CD4+CD127-CD49d-CD26-. En una realización más preferida, la muestra biológica se trata simultáneamente con anti-CD8, anti-CD26, anti-CD127 y anti-CD49d.

La figura 1 es un diagrama en el que se muestra una realización preferida del método primero de la invención. El protocolo parte de sangre venosa de un individuo normal o de un paciente con una enfermedad inflamatoria. A partir de dicha sangre se obtienen las células periféricas de sangre humana (PBMCs). Las PBMCs son incubadas con cuentas magnéticas recubiertas de un anticuerpo anti-biotina, que reconocen los anticuerpos biotinilados anti-CD8, anti-CD26, anti-CD127 y anti-CD49d con los que también son incubados las células. Las PBMCs se hacen pasar a través de una columna o soporte, que retiene debido al efecto del imán sólo las células no reguladoras “etiquetadas” con las cuentas magnéticas. En cambio, las nTreg no son capturadas y son obtenidas libres de anticuerpos unidos.

En una realización más preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) se emplea además un anticuerpo anti-CD45RO, de manera que las nTreg aisladas son CD45RA+. La ventaja de usar dicho anticuerpo anti-CD45RO como anticuerpo adicional en el método primero de la invención es que se aísla una población específica de células nTreg, denominada células nTreg “naïve” CD45RA+ T, con gran eficacia y pureza.

En otra realización más preferida del método primero de la invención, en la etapa (a) se emplea además un anticuerpo anti-CD45RA, de manera que las nTreg aisladas son CD45RO+. La ventaja de usar dicho anticuerpo anti-CD45RA como anticuerpo adicional en el método primero de la invención es que se aísla una población específica de células nTreg, denominada células nTreg CD45RO+ T de “memoria”, con gran eficacia y pureza.

El término “anticuerpo” tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con una proteína. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la proteína y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga. La expresión “anticuerpo anti-X” se refiere a un anticuerpo capaz de reconocer específicamente una proteína X determinada; por ejemplo, un anticuerpo anti-CD26 es un anticuerpo capaz de reconocer específicamente la proteína CD26. Anticuerpos que pueden emplearse en la presente invención son conocidos en el estado de la técnica, como los que se describen, pero sin limitarse, en los ejemplos de la presente descripción.

Los anticuerpos empleados en el método primero de la invención pueden estar marcados o inmovilizados. La ventaja de usar anticuerpos marcados o inmovilizados con respecto a usarlos sin marcar o inmovilizar es que facilitan su adaptación a técnicas estándar de aislamiento y que pueden emplearse con equipamiento estándar. Por tanto, en una realización preferida del método primero de la invención, al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está marcado o inmovilizado.

El término “marcado”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo está conjugado con una etiqueta. Son conocidos en el estado de la técnica un elevado número de etiquetas que pueden ser conjugadas a un anticuerpo. Ejemplos de etiquetas que pueden ser empleadas para marcar un anticuerpo son, pero sin limitarnos, radioisótopos [por ejemplo, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S o <sup>3</sup>H], marcadores fluorescentes o luminiscentes [por ejemplo, fluoresceína (FITC), rodamina, *texas red*, ficoeritrina (PE), alofococianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)]; fragmentos de anticuerpos [por ejemplo, fragmentos F(ab)<sub>2</sub>], etiquetas de afinidad [por ejemplo, biotina, avidina, agarosa, proteína morfogenética del hueso (BMP), haptenos], enzimas o sustratos de enzimas [por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP) y peroxidasa de rábano picante (HRP)].

En una realización preferida del método primero de la invención, al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está marcado. En una realización más preferida del método primero de la invención, al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está marcado y además uniformemente; la ventaja de marcar uniformemente los anticuerpos es que todos los anticuerpos pueden ser detectados a la vez. En una realización preferida del método primero de la invención, al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un sustrato de una enzima.

## ES 2 363 545 B2

5 El término “inmovilizado”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a que el anticuerpo puede ser unido a un soporte sin perder su actividad. Preferiblemente, el soporte puede ser la superficie de una matriz, (por ejemplo, una matriz de nylon), una placa de microvaloración (por ejemplo, de 96 pocillos) o soporte de plástico similar, o bien cuentas (*esferas*, por ejemplo, *esferas* de agarosa o microesferas pequeñas superparamagnéticas compuestas de matrices biodegradables).

10 En una realización preferida del método primero de la invención, al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está inmovilizado. En una realización más preferida del método primero de la invención, al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está inmovilizado en un soporte seleccionado de la lista que comprende: una matriz de nylon, en un soporte de plástico o en cuentas.

15 Son conocidos en el estado de la técnica diversos métodos por medio de los cuales se puede llevar a cabo la separación de las células nTreg en la etapa (b) del método primero de la invención. En una realización preferida del método primero de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo mediante al menos un método seleccionado de la lista que comprende: centrifugación, separación celular activada por fluorescencia/FACS, separación magnética celular, separación inmunológica basada en columna, adhesión celular, lisis mediante complemento, o con cualquiera de sus combinaciones. En una realización más preferida del método primero de la invención la separación se lleva a cabo mediante métodos como FACS o sistemas magnéticos.

20 La expresión “separación inmunológica basada en columna”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un método para clasificar células, donde los anticuerpos empleados en el método primero de la invención se encuentran unidos a resinas de columnas de cromatografía y de esta manera se emplean para unir las células que expresan en su superficie la molécula reconocida por el anticuerpo específico.

25 La expresión “separación celular activada por fluorescencia” o FACS está referida, tal y como se usa en la presente descripción, a un método que permite clasificar células tras la unión previa a éstas de anticuerpos que llevan unidos fluorocromos y que son específicos de ciertas moléculas que se encuentran en la superficie celular.

30 La expresión “sistemas magnéticos”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a métodos de purificación celular en donde se emplean anticuerpos que reconocen de modo específico moléculas expresadas en la superficie de ciertas células y que están unidos a esferas magnéticas o son reconocidos por otras moléculas (anticuerpos, etc) unidos a dichas esferas magnéticas, de modo que las células pueden ser retenidas por efecto de campo magnético generado por un imán.

35 El término “muestra biológica aislada”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere, pero no se limita, a poblaciones celulares y a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferiblemente, la muestra biológica aislada comprende células y, más preferiblemente, linfocitos. Ejemplos de tejidos que comprenden linfocitos son, pero sin limitarse, bazo, timo, ganglio linfático, médula ósea, placa de Peyer y amígdala. Ejemplos de fluidos que comprenden linfocitos son, pero sin limitarse, fluido sinovial, linfa, líquido cefalorraquídeo, orina, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido amniótico o exudado (por ejemplo, nasofaríngeo, vaginal, uretral, conjuntival u ópticos) o sangre. Ejemplos de poblaciones celulares que comprenden linfocitos son, pero sin limitarse, concentrado leucocitario (*buffy coat*), células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), linfocitos de sangre periférica (PBLs) o líneas celulares. Por tanto, en una realización preferida, la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que comprende: bazo, timo, ganglio linfático, médula ósea, placa de Peyer, amígdala, fluido sinovial, linfa, líquido cefalorraquídeo, orina, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido amniótico, exudado, sangre, concentrado leucocitario, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica o líneas celulares. En una realización más preferida la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que comprende: sangre, concentrado leucocitario, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica, bazo o ganglio linfático.

50 El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente, un humano. Por tanto, el método primero de la invención es un método para aislar células nTreg de un animal, más preferiblemente células nTreg de un mamífero, y aún más preferiblemente, células nTreg humanas.

55 La ventaja principal de usar CD26 como marcador para aislar células nTreg es que permite la purificación de este tipo celular independientemente del grado de activación de los linfocitos de la muestra biológica de partida del método primero de la invención, y es por tanto muy adecuado para aislar muestras biológicas de sujetos en los que puede haber linfocitos activados. Por tanto, en una realización preferida, la muestra biológica proviene de un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad parasitaria.

60 El término “enfermedad inflamatoria”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a aquella en las que tienen lugar lesiones causadas por una reacción inmunitaria o una reacción inflamatoria del organismo. Algunos ejemplos de enfermedades inflamatorias son, por ejemplo, pero sin limitarse conjuntivitis, iritis, uveítis, retinitis, otitis mastoiditis, rinitis, laberintitis, sinusitis, faringitis, tonsilitis, bronquitis, neumonía, bronconeumonía, pleuritis, mediastinitis, endocarditis, tromboflebitis, poliarteritis, nefritis, cistitis, estomatitis, esofaguitis, gastritis, colitis, apendicitis, hepatitis, colecistitis, pancreatitis, peritonitis, tiroiditis, dermatitis, encefalitis, meningitis, neuromielitis óptica,

## ES 2 363 545 B2

polineuritis, polimiositis, miositis osificante, osteoartritis o artritis reumatoide. Algunas enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide, son trastornos de naturaleza autoinmune.

El término “enfermedad autoinmune”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un proceso patológico que cursa con una respuesta inmunitaria contra el propio organismo. Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitarse, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, diabetes tipo I, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, síndrome de Reiter, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, polimialgia reumática o artritis reumatoide.

Los términos “enfermedad alérgica” o “alergia”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una reacción de hipersensibilidad a una determinada sustancia (o alérgeno) mediada por mecanismos inmunológicos. En función del tipo de alérgeno puede tratarse, por ejemplo, pero sin limitarse, de alergia al polen de las flores o a otros productos vegetales, alergia medicamentosa, alergia alimenticia, alergia a sustancias epidérmicas de los animales, alergia a los productos bacterianos o alergia infecciosa, alergia a los ácaros del polvo, alergia a metales, alergia al látex o alergia a las picaduras de insectos.

El término “enfermedad infecciosa”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la manifestación clínica consecuente a una infección provocada por un microorganismo, como por ejemplo, pero sin limitarse, un bacteria, un hongo, un virus o un protozoo.

El término “enfermedad parasitaria”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a la manifestación clínica consecuente a una infección o una infestación provocada por un protozoo, un helmineto o un artrópodo.

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere a un kit (de aquí en adelante, kit primero de la invención), que comprende:

- a) un anticuerpo anti-CD26, y
- b) al menos un anticuerpo seleccionado de la lista que comprende:
  - i) un anticuerpo anti-CD25,
  - ii) un anticuerpo anti-CD127, y
  - iii) un anticuerpo anti-CD49d.

En una realización preferida, el kit primero de la invención comprende un anticuerpo anti-CD26 y un anticuerpo anti-CD25. En otra realización preferida, el kit primero de la invención comprende un anticuerpo anti-CD26 y un anticuerpo anti-CD127. En otra realización preferida del método primero de la invención, el kit primero de la invención comprende un anticuerpo anti-CD26 y un anticuerpo anti-CD49d. En otra realización preferida, el kit primero de la invención comprende un anticuerpo anti-CD26, un anticuerpo anti-CD127 y un anticuerpo anti-CD49d. En otra realización preferida, el kit primero de la invención comprende un anticuerpo anti-CD26, un anticuerpo anti-CD25 y un anticuerpo anti-CD49d. En otra realización preferida, el kit primero de la invención comprende un anticuerpo anti-CD26, un anticuerpo anti-CD25, un anticuerpo anti-CD127 y un anticuerpo anti-CD49d.

En una realización más preferida, el kit primero de la invención comprende además al menos un anticuerpo que reconoce una molécula presente en células que no son linfocitos T CD4+. En una realización aún más preferida, el kit primero de la invención comprende además al menos un anticuerpo seleccionado de la lista que comprende: anti-CD8, anti-CD11b/Mac1, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD41a, anti-CD56, anti-CD123, anti-CD235a y anti- $\gamma\delta$ TCR.

En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit primero de la invención está marcado o inmovilizado. En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit primero de la invención está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un sustrato de una enzima. En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit primero de la invención está inmovilizado en una matriz de nylon, en un soporte de plástico o en cuentas.

En una realización preferida, el kit primero de la invención comprende además al menos un elemento necesario para separar las células nTreg. Así, el kit primero de la invención puede comprender elementos que permitan la separación de las nTreg mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, un método seleccionado de la lista que comprende: centrifugación, separación celular activada por fluorescencia/FACS, separación magnética celular, separación inmunológica basada en columna, adhesión celular o lisis mediante complemento. En una realización preferida, el kit primero de la invención comprende, además, al menos un elemento necesario para la separación de las células nTreg seleccio-

## ES 2 363 545 B2

nado de la lista que comprende: columnas, soportes de columnas, tubos de recolección de fracciones, imanes, tamices para eliminar los agregados celulares, soluciones que contengan factores de complemento, soluciones isotónicas de lavado, soluciones de separación/enriquecimiento celular (por ejemplo, Ficoll-Paque™), cuentas superparamagnéticas, placas o soportes de plástico con anticuerpos u otras moléculas unidas (por ejemplo, estreptavidina), componentes que permitan la eliminación de las células muertas antes del proceso de purificación o bien soluciones de yoduro de propidio o 7-AAD para la exclusión de las células muertas durante la evaluación por citometría de flujo de la pureza de las nTreg una vez están éstas aisladas. También, anticuerpos unidos a fluorocromos (por ejemplo, CD4-FITC, FoxP3-PE y CD25-APC) y soluciones de permeabilización celular para evaluar por citometría de flujo la pureza de las nTreg una vez purificadas.

El kit puede contener además cualquier otro reactivo necesario para llevar a cabo el método primero de la invención como, por ejemplo, pero sin limitarse, controles positivos y/o negativos, soluciones de lavado isotónicas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Además, el kit puede incluir cualquier soporte y/o recipiente necesario para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método primero de la invención.

Un tercer aspecto de la presente invención, se refiere al uso del kit primero de la invención para aislar o purificar células nTreg de una muestra biológica aislada. Preferiblemente, la muestra biológica proviene de un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad parasitaria.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar células nTreg en una muestra biológica aislada (de aquí en adelante, método segundo de la invención), que comprende las siguientes etapas:

- a) detectar en la muestra biológica el producto de expresión del gen *CD26*, y el producto de expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *CD25*, *FoxP3*, *CD127*, *CD49d*, o cualquiera de sus combinaciones,
- b) comparar la cantidad del producto de expresión de los genes detectada en la etapa (a) con una cantidad de referencia, y
- c) asignar a la comparación realizada la identificación de las células nTreg en la etapa (b), cuando la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*, y cuando:
  - la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*, o
  - la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*, o
  - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*, o
  - la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*, o cualquiera de sus combinaciones.

El método segundo de la invención permite la identificación de células nTreg en una muestra biológica aislada. Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante este método. Preferiblemente, los pasos (a) y/o (b) del método segundo de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (a) o la comparación computerizada en el paso (b).

Tal y como se demuestra en los ejemplos de la presente descripción, las células nTreg pueden ser identificadas dentro de una muestra biológica mediante la detección de la cantidad del producto de la expresión del gen *CD26* y de uno de los genes *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*. Para identificar las células nTreg también es posible emplear, además de la detección del producto de la expresión del gen *CD26*, la detección de la cantidad del producto de cualquiera de las combinaciones de los genes *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*, por ejemplo, de dos de estos genes, de tres de estos genes o de los cuatro genes. La ventaja de detectar el producto de la expresión de un menor número de genes es que la identificación de las células nTreg es menos laboriosa, más simple, rápida y barata. La ventaja de detectar el producto de la expresión de un número mayor de genes es que la identificación de las células nTreg es más fiable.

Tal y como se demuestra en los ejemplos, el fenotipo CD25+CD26- permite diferenciar la población de células nTreg de la población de células T efectoras, independientemente del grado de activación de la población de células T de partida. Por tanto, en una realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta

## ES 2 363 545 B2

el producto de expresión de los genes *CD26* y *CD25*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*.

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26* y *CD25*, en la etapa (c) el fenotipo CD25+CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

Asimismo, tal y como se demuestra en los ejemplos, el fenotipo FoxP3+CD26- permite diferenciar la población de células nTreg de la población de células T efectoras, independientemente del grado de activación de la población de células T de partida. Por tanto, en otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26* y *FoxP3*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*.

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26* y *FoxP3*, en la etapa (c) el fenotipo FoxP3+CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

Para la identificación de las células nTreg puede emplearse el marcador de selección negativa CD26 y al menos un marcador de selección positiva como, por ejemplo, CD25 o FoxP3. Sin embargo, es posible emplear además del marcador de selección negativa CD26, al menos otro marcador de selección negativa como, por ejemplo, CD127 o CD49d.

La expresión “marcador de selección positiva”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al producto de la expresión de un gen que se detecta en las células deseadas, por ejemplo, las células nTreg, mientras que no se detecta en las células no deseadas. Ejemplos marcadores de selección positiva de las células nTreg son, por ejemplo, pero sin limitarnos, los productos de expresión de los genes *CD4*, *CD25* o *FoxP3*.

La expresión “marcador de selección negativa”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al producto de la expresión de un gen que se detecta en las células no deseadas, mientras que no se detecta en las células deseadas por ejemplo, las células nTreg. Ejemplos de marcadores de selección negativa de las células nTreg son, por ejemplo, pero sin limitarnos, los productos de expresión de los genes *CD26*, *CD127* o *CD49d*.

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26* y *CD49d*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26* y *CD49d* en la etapa (c) el fenotipo *CD49d*-*CD26*- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26* y *CD127*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*.

## ES 2 363 545 B2

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo CD127-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

5 Las células nTreg pueden ser identificadas dentro de una muestra biológica mediante la detección de la cantidad del producto de la expresión del gen *CD26* y de dos o tres de los genes *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*. Asimismo, pueden identificarse las células nTreg detectando la cantidad del producto de la expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*. La ventaja de detectar el producto de la expresión de un número mayor de genes es que la identificación de las células nTreg es más fiable.

10 En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25* y *FoxP3* de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- 15 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*, y
- 20 - la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*.

25 Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25* y *FoxP3* en la etapa (c) el fenotipo CD25+FoxP3+CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

30 En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25* y *CD127*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- 35 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*, y
- 40 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*.

45 Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo CD25+CD127-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *FoxP3* y *CD127*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- 50 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*, y
- 55 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*.

60 Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *FoxP3* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo FoxP3+CD127-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

65

## ES 2 363 545 B2

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25* y *CD49d*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- 5 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*, y
- 10 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

15 Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo CD25+CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

20 En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *FoxP3* y *CD49d*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- 25 - la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

35 Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *FoxP3* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo FoxP3+CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD127* y *CD49d*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- 40 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127* y
- 45 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

50 Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo CD127-CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

55 En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *FoxP3* y *CD127*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- 60 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*, y
- 65 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*.

## ES 2 363 545 B2

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD25*, *CD26*, *FoxP3* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo CD25+FoxP3+CD127-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

5 En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *FoxP3* y *CD49d*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- 10 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*,
- 15 - la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

20

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *FoxP3* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo CD25+FoxP3+CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

25

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *CD127* y *CD49d* de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- 30 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*,
- 35 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

40

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo CD25+CD127-CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

45

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

50

- la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*,
- 55 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*, y
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

60

Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo FoxP3+CD127-CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

65

## ES 2 363 545 B2

En otra realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d* de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando:

- 5 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*,
- 10 - la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*,
- la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*, y
- 15 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*.

20 Es decir, cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo CD25+FoxP3+CD127-CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

25 En una realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta además la cantidad del producto de expresión del gen *CD4*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando la cantidad del producto de expresión del gen *CD4* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD4*, cuando la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*, y cuando:

- 30 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*, o
- la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*, o
- 35 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*, o
- 40 - la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d*, o
- cualquiera de sus combinaciones.

45 Es decir, el criterio CD4+ se incorpora cualquiera de los fenotipos anteriormente descritos como indicativos de células nTreg; a continuación se describen diferentes realizaciones alternativas del método segundo de la invención que tienen en cuenta este criterio. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26* y *CD25*, en la etapa (c) el fenotipo CD4+CD25+CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26* y *FoxP3*, en la etapa (c) el fenotipo CD4+FoxP3+CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26* y *CD49d* en la etapa (c) el fenotipo CD4+CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo CD4+CD127-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *CD25* y *FoxP3* en la etapa (c) el fenotipo CD4+CD25+FoxP3+CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *CD25* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo CD4+CD25+CD127-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *FoxP3* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo CD4+FoxP3+CD127-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *CD25* y *CD49d* en la etapa (c) el fenotipo CD4+CD25+CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *FoxP3* y *CD49d* en la etapa (c) el fenotipo CD4+FoxP3+CD49d-CD26- es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión

## ES 2 363 545 B2

de los genes *CD4*, *CD26*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo *CD4+CD127-CD49d-CD26-* es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD25*, *CD26*, *FoxP3* y *CD127* en la etapa (c) el fenotipo *CD4+CD25+FoxP3+CD127-CD26-* es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *CD25*, *FoxP3* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo *CD4+CD25+FoxP3+CD49d-CD26-* es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *CD25*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo *CD4+CD25+CD127-CD49d-CD26-* es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo *CD4+FoxP3+CD127-CD49d-CD26-* es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica. Cuando en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta el producto de expresión de los genes *CD4*, *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d* la etapa (c) el fenotipo *CD4+CD25+FoxP3+CD127-CD49d-CD26-* es indicativo de la presencia de células nTreg en la muestra biológica.

En una realización preferida, en la etapa (a) del método segundo de la invención se detecta además la cantidad del producto de expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *TCR $\alpha\beta$* , *CD3*, *CD5*, *CD11a/LFA-1*, *CD27*, *CD28*, *CD30*, *CD31*, *CD38*, *CD39*, *CD44*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD45RC*, *CD54/ICAM-1*, *CD57*, *CD58*, *CD62L/L-selectina*, *CD62P/P-selectina*, *CD71*, *CD73*, *CD83*, *CD80*, *CD86*, *CD95/Fas/APO-1*, *CD101*, *CD103*, *CD122/IL-2R $\beta$* , *CD132*, *CD134/OX-40*, *CD137/4-1BB*, *CD152/CTLA-4*, *CD154/CD40L*, *CD223/LAG-3*, *PD-1*, *PD-L1*, *GITR*, *IL-10*, *TGF $\beta$* , *galectina-1*, *Neuropilina/NRP*, *Neopterin*, *TNFR2*, *TGF $\beta$ R1*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83*, *HLA-DR*, *ICOS*, *GARP*, *FR4*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR8*, *CRTH2*, *CCR7*, *CCR4*, *CCR8*, *CCR5*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CLA*, *granzima A* y *granzima B*. Algunos de estos genes son marcadores de selección positiva, otros son marcadores de selección negativa y otros permiten diferenciar una población específica de células nTreg.

Son marcadores de selección positiva que pueden emplearse adicionalmente en la etapa (a) del método segundo de la invención, por ejemplo, pero sin limitarnos, *TCR $\alpha\beta$* , *CD3*, *CD5*, *CD39*, *CD44*, *CD58*, *CD71*, *CD73*, *CD83*, *CD95/Fas/APO-1*, *CD122/IL-2R $\beta$* , *CD132*, *CD152/CTLA-4*, *PD-1*, *PD-L1*, *GITR*, *galectina-1*, *Neuropilina/NRP*, *Neopterin*, *HLA-DR*, *ICOS*, *FR4* y *CLA*. En una realización preferida del método de la invención en la etapa (a) se detecta además el producto de la expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *TCR $\alpha\beta$* , *CD3*, *CD5*, *CD39*, *CD44*, *CD58*, *CD71*, *CD73*, *CD83*, *CD95/Fas/APO-1 (+)*, *CD122/IL-2R $\beta$* , *CD132*, *CD152/CTLA-4*, *PD-1*, *PD-L1*, *GITR*, *galectina-1*, *Neuropilina/NRP*, *Neopterin*, *HLA-DR*, *ICOS*, *FR4* y *CLA*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando la cantidad del producto de expresión de cualquiera de esos genes detectada en la etapa (a) es significativamente mayor que la cantidad de referencia para dichos genes. Así, los criterios *TCR $\alpha\beta$ +*, *CD3+*, *CD5+*, *CD39+*, *CD44+*, *CD58+*, *CD71+*, *CD73+*, *CD83+*, *CD95/Fas/APO-1+*, *CD122/IL-2R $\beta$ +*, *CD132+*, *CD152/CTLA-4+*, *PD-1+*, *PD-L1+*, *GITR+*, *galectina-1+*, *Neuropilina/NRP+*, *Neopterin+*, *HLA-DR+*, *ICOS+*, *FR4+* y *CLA+* pueden ser incorporados a cualquiera de los fenotipos anteriormente descritos como indicativos de células nTreg.

Son marcadores de selección negativa que pueden emplearse adicionalmente en la etapa (a) del método segundo de la invención, por ejemplo, pero sin limitarnos, *CD57*, *CD137/4-1BB*, *CD154/CD40L*, *CRTH2* y *granzima B*. Por tanto, en una realización preferida del método de la invención en la etapa (a) se detecta además el producto de la expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *CD57*, *CD137/4-1BB*, *CD154/CD40L*, *CRTH2* y *granzima B*, de manera que en la etapa (c) se asigna la identificación de las células nTreg cuando la cantidad del producto de expresión de cualquiera de esos genes detectada en la etapa (a) es significativamente menor que la cantidad de referencia para dichos genes. Así, los criterios *CD57-*, *CD137/4-1BB-*, *CD154/CD40L-*, *CRTH2-* y *granzima B-* pueden ser incorporados a cualquiera de los fenotipos anteriormente descritos como indicativos de células nTreg.

Genes que permiten diferenciar una población específica de células nTreg que pueden emplearse adicionalmente en la etapa (a) del método segundo de la invención, por ejemplo, pero sin limitarnos, *CD11a/LFA-1*, *CD27*, *CD30*, *CD31*, *CD38*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD45RC*, *CD54/ICAM-1*, *CD62L/L-selectina*, *CD62P/P-selectina*, *CD80*, *CD86*, *CD101*, *CD103*, *CD134/OX-40*, *CD223/LAG-3*, *IL-10*, *TGF $\beta$* , *TNFR2*, *TGF $\beta$ R1*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83*, *GARP*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR8*, *CCR7*, *CCR4*, *CCR8*, *CCR5*, *CXCR4*, *CXCR5* y *granzima A*. Por tanto, en una realización preferida del método de la invención en la etapa (a) se detecta además el producto de la expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *CD11a/LFA-1*, *CD27*, *CD30*, *CD31*, *CD38*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD45RC*, *CD54/ICAM-1*, *CD62L/L-selectina*, *CD62P/P-selectina*, *CD80*, *CD86*, *CD101*, *CD103*, *CD134/OX-40*, *CD223/LAG-3*, *IL-10*, *TGF $\beta$* , *TNFR2*, *TGF $\beta$ R1*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83*, *GARP*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR8*, *CCR7*, *CCR4*, *CCR8*, *CCR5*, *CXCR4*, *CXCR5* y *granzima A*, de manera que en la etapa (c) se identifica una subpoblación de células nTreg *CD11a/LFA-1+*, *CD27+*, *CD30+*, *CD31+*, *CD38+*, *CD45RA+*, *CD45RB+*, *CD45RO+*, *CD45RC+*, *CD54/ICAM-1+*, *CD62L/L-selectina+*, *CD62P/P-selectina+*, *CD80+*, *CD86+*, *CD101+*, *CD103+*, *CD134/OX-40+*, *CD223/LAG-3+*, *IL-10+*, *TGF $\beta$ +*, *TNFR2+*, *TGF $\beta$ R1+*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83+*, *GARP+*, *TLR4+*, *TLR5+*, *TLR8+*, *CCR7+*, *CCR4+*, *CCR8+*, *CCR5+*, *CXCR4+*, *CXCR5+* y *granzima A+* cuando la cantidad de sus productos de expresión detectados en la etapa (a) es significativamente mayor que la cantidad de referencia.

## ES 2 363 545 B2

El término “producto de expresión”, tal y como se emplea en la presente descripción, hace referencia a sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína), o a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o expresión. En una realización preferida, el producto de expresión de los genes detectado en el paso (a) es el ARNm. En una realización preferida, el producto de expresión de los genes detectado en el paso (a) es una proteína.

La expresión “detección del producto de expresión” de los genes en la muestra biológica, tal y como se emplea en la presente descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La expresión “medida directa de la cantidad de producto de expresión” se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión de los genes basada en una señal que se obtiene directamente de los productos de la expresión de los genes y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto de la expresión de los genes presente en la muestra. Dicha señal puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión. La expresión “medida indirecta de la cantidad de producto de expresión” se refiere a la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo, pero sin limitarnos, la medida de respuestas celulares, ligandos, etiquetas o productos de reacción enzimática).

De acuerdo con la presente invención, la detección del producto de expresión de los genes puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de expresión. En una realización preferida, la detección del producto de expresión de los genes se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción donde el análisis del nivel de ARNm se puede realizar, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción encadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; *arrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; *arrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear (RMN) o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

En una realización más preferida, la detección de la cantidad de producto de expresión de los genes en la muestra biológica se realiza determinando el nivel de las proteínas codificadas por dichos genes, mediante la incubación con un anticuerpo específico, en ensayos como *Western blot*, geles de electroforesis, inmunoprecipitación, *arrays* de proteína, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante la incubación con un ligando específico, por ejemplo adenosina deaminasa, en el caso de CD26; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen; o, por ejemplo, mediante técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas.

La proteína CD26 tiene actividad dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). Por tanto, también es posible detectar la proteína CD26 analizando su actividad dipeptidil peptidasa IV, como por ejemplo podría hacerse empleando el sustrato fluorogénico [Ala-Pro]<sup>2</sup>-violeta de cresilo, en combinación con microscopía confocal o citometría de flujo.

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa del producto de expresión del gen, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con la misma o que pueda derivarse de ésta. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los productos de expresión de los genes especificados obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopia de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad del producto de expresión de uno de los genes de la muestra biológica a analizar con una cantidad de referencia deseable. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad del producto de expresión que permite asignar la identificación de una célula nTreg. En el caso de ciertos experimentos esta cantidad de referencia se puede determinar mediante el uso de anticuerpos control, con el mismo isotipo y las mismas etiquetas moleculares que los anticuerpos específicos empleados, que no reconozcan antígeno alguno dentro de la muestra con la que se está trabajando. Dicha cantidad de referencia también se puede determinar mediante muestras de RNA total o mRNA, o bien de mezclas proteicas o lisados, procedentes de tejidos o células en los que ha sido descrita la inexistencia natural de mRNA, proteína, codificada o actividad enzimática asociada al gen en cuestión. La cantidad de referencia también se puede establecer mediante muestras de RNA total o mRNA, o bien de mezclas proteicas o lisados, procedentes de tejidos o células en los que ha sido eliminado el producto o los productos asociados al gen en cuestión, como el mRNA, proteína o actividad enzimática, mediante medios, sin excluir otros, como sondas nucleotídicas o péptidos neutralizantes o inhibidores químicos específicos.

## ES 2 363 545 B2

Preferiblemente, el método segundo de la invención es un método para identificar células nTreg de un animal, más preferiblemente células nTreg de un mamífero, y aún más preferiblemente, células nTreg humanas.

5 Un quinto aspecto de la presente invención, se refiere a un kit (de aquí en adelante, kit segundo de la invención), que comprende los elementos necesarios para detectar en una muestra biológica el producto de expresión del gen *CD26*, y el producto de expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *CD25*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d*.

10 En una realización preferida, el kit segundo de la invención comprende los elementos necesarios para detectar en una muestra biológica el producto de expresión del gen *CD26*, y el producto de expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *CD25*, *FoxP3*, *CD127* y *CD49d*, donde dichos elementos se seleccionan de entre:

- 15 - una sonda que permite detectar el producto de expresión de un gen seleccionado de la lista que comprende: *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*, o
- un cebador que permite detectar el producto de expresión de un gen seleccionado de la lista que comprende: *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*, o
- 20 - un anticuerpo que permite detectar una proteína seleccionada de la lista que comprende: *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*, o
- un reactivo que permite detectar la actividad dipeptidil peptidasa IV de la proteína *CD26*,
- 25 o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización más preferida, el kit segundo de la invención además comprende un anticuerpo o una sonda que permite detectar el producto de expresión del gen *CD4*. En una realización aún más preferida, el kit segundo de la invención además comprende un anticuerpo o una sonda que permite que permite detectar el producto de expresión de al menos un gen seleccionado de la lista que comprende: *CD3*, *CD5*, *CD11a/LFA-1*, *CD27*, *CD38*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD54/ICAM-1*, *CD62UL-selectina*, *CD62P/P-selectina*, *CD73*, *CD86/B7-2*, *CD95/Fas/APO-1*, *CD103*, *CD122/IL-2R $\beta$* , *CD134/OX-4Q*, *CD137/4-1BB*, *CD152/CTLA-4*, *CD154/CD40L*, *CD279/PD-1*, *GITR*, *IL-10*, *TGF $\beta$* , *galactina-1*, *Neuropilina/NRP*, *TNFR2*, *TGF $\beta$ R1*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83* y *HLA-DR*.

35 El término “sonda”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN o ARN monocatenario con una secuencia de bases específica, preferiblemente marcada, que se utiliza para detectar secuencias de bases complementarias al producto de la expresión de un gen por hibridación parcial o total. Las sondas pueden ser, por ejemplo, pero sin limitarnos, un oligonucleótido, un fragmento amplificado por PCR o un fragmento de ADN purificado. La expresión “sonda del producto de expresión del gen” se refiere a una sonda que permite detectar la expresión de dicho gen, es decir, se refiere a una sonda complementaria al ARNm o al ADNc de dicho gen.

En una realización preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26* y una sonda del producto de expresión de un gen seleccionado de la lista que comprende: *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*. En una realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26* y una sonda del producto de expresión del gen *CD25*. En una realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26* y una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26* y una sonda del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26* y una sonda del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *CD25* y una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *CD25* y una sonda del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3* y una sonda del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *CD25* y una sonda del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3* y una sonda del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *CD25*, una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3* y una sonda del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *CD25*, una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3* y una sonda del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de

## ES 2 363 545 B2

la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3* y una sonda del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *CD25*, una sonda del producto de expresión del gen *CD127* y una sonda del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3*, una sonda del producto de expresión del gen *CD127* y una sonda del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende una sonda del producto de expresión del gen *CD26*, una sonda del producto de expresión del gen *CD25*, una sonda del producto de expresión del gen *FoxP3*, una sonda del producto de expresión del gen *CD127* y una sonda del producto de expresión del gen *CD49d*. En una realización aún más preferida, el kit segundo de la invención comprende además una sonda del producto de expresión del gen *CD4*. En una realización aún más preferida, el kit segundo de la invención comprende además una sonda del producto de expresión de un gen seleccionado de la lista que comprende: *TCRαβ*, *CD3*, *CD5*, *CD11a/LFA-1*, *CD27*, *CD28*, *CD30*, *CD31*, *CD38*, *CD39*, *CD44*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD45RC*, *CD54/ICAM-1*, *CD57*, *CD58*, *CD62LL-selectina*, *CD62PP-selectina*, *CD71*, *CD73*, *CD83*, *CD80*, *CD86*, *CD95/Fas/APO-1*, *CD101*, *CD103*, *CD122/IL-2Rβ*, *CD132*, *CD134/OX-40*, *CD137/4-1BB*, *CD152/CTLA-4*, *CD154/CD40L*, *CD223/LAG-3*, *PD-1*, *PD-L1*, *GITR*, *IL-10*, *TGFβ*, *galectina-1*, *Neuropilina/NRP*, *Neopterin*, *TNFR2*, *TGFβRI*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83*, *HLA-DR*, *ICOS*, *GARP*, *FR4*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR8*, *CRTH2*, *CCR7*, *CCR4*, *CCR8*, *CCR5*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CLA*, *granzima A* y *granzima B*.

El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido de ADN o ARN complementario a la secuencia de un ácido nucleico molde determinado, que actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos en el proceso de copia de la cadena complementaria a la secuencia de dicho ácido nucleico molde, por ejemplo, pero sin limitarnos en una PCR. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de ADN. La expresión “cebador del producto de expresión del gen” se refiere a un cebador que permite detectar la expresión de dicho gen, es decir, se refiere a un cebador complementario al ARNm o al ADNc de dicho gen. Cebadores que pueden emplearse en la presente invención son conocidos en el estado de la técnica o pueden diseñarse con facilidad a partir de la secuencia de los genes, por ejemplo, a partir de la secuencia de los genes *CD26*, *CD25*, *FoxP3*, *CD127*, *CD49d* o *CD4*.

En una realización preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26* y un cebador del producto de expresión de un gen seleccionado de la lista que comprende: *CD25*, *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*. En una realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD25*. En una realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD25* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD25* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD25*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD25*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD25*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD127* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD127* y al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD26*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD25*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *FoxP3*, al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD127* y al menos un cebador del producto de

expresión del gen *CD49d*. En una realización aún más preferida, el kit segundo de la invención comprende además al menos un cebador del producto de expresión del gen *CD4*. En una realización aún más preferida, el kit segundo de la invención comprende además al menos un cebador del producto de expresión de un gen seleccionado de la lista que comprende: *TCRa $\beta$* , *CD3*, *CD5*, *CDHa/LFA-1*, *CD27*, *CD28*, *CD30*, *CD31*, *CD38*, *CD39*, *CD44*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD45RC*, *CD54/ICAM-1*, *CD57*, *CD58*, *CD62L/L-selectina*, *CD62P/P-selectina*, *CD71*, *CD73*, *CD83*, *CD80*, *CD86*, *CD95/Fas/APO-1*, *CD101*, *CD103*, *CD122/IL-2R $\beta$* , *CD132*, *CD134/OX-40*, *CD137/4-1 BB*, *CD152/CTLA-4*, *CD154/CD40L*, *CD223/LAG-3*, *PD-1*, *PD-L1*, *GITR*, *IL-10*, *TGF $\beta$* , *galectina-1*, *Neuropilina/NRP*, *Neopterina*, *TNFR2*, *TGF $\beta$ R1*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83*, *HLA-DR*, *ICOS*, *GARP*, *FR4*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR8*, *CRTH2*, *CCR7*, *CCR4*, *CCR8*, *CCR5*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CLA*, *granzima A* y *granzima B*.

En una realización preferida, el kit segundo de la invención comprende al menos un anticuerpo anti-*CD26* y un anticuerpo seleccionado de la lista que comprende: un anticuerpo anti-*CD25*, anticuerpo anti-FoxP3, anticuerpo anti-*CD127* o anticuerpo anti-*CD49d*. En una realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26* y un anticuerpo anti-*CD25*. En una realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26* y un anticuerpo anti-FoxP3. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26* y un anticuerpo anti-*CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26* y un anticuerpo anti-*CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-*CD25* y un anticuerpo anti-FoxP3. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-*CD25* y un anticuerpo anti-*CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-FoxP3 y un anticuerpo anti-*CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-*CD25* y un anticuerpo anti-*CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-FoxP3 y un anticuerpo anti-*CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-*CD127* y un anticuerpo anti-*CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-FoxP3 y un anticuerpo anti-*CD127*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-*CD25*, un anticuerpo anti-*CD127* y un anticuerpo anti-*CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-*CD25*, un anticuerpo anti-FoxP3 y un anticuerpo anti-*CD49d*. En otra realización más preferida, el kit segundo de la invención comprende un anticuerpo anti-*CD26*, un anticuerpo anti-*CD127* y un anticuerpo anti-*CD49d*. En una realización aún más preferida, el kit segundo de la invención comprende además un anticuerpo anti-*CD4*. En una realización aún más preferida, el kit segundo de la invención comprende además un anticuerpo seleccionado de la lista que comprende: anticuerpo anti-*CD3*, anticuerpo anti-*CD5*, anticuerpo anti-*CD11a/LFA-1*, anticuerpo anti-*CD27*, anticuerpo anti-*CD38*, anticuerpo anti-*CD45RA*, anticuerpo anti-*CD45RB*, anticuerpo anti-*CD45RO*, anticuerpo anti-*CD54/ICAM-1*, anticuerpo anti-*CD62L/L-selectina*, anticuerpo anti-*CD62P/P-selectina*, anticuerpo anti-*CD73*, anticuerpo anti-*CD86/B7-2*, anticuerpo anti-*CD95/Fas/APO-1*, anticuerpo anti-*CD103*, anticuerpo anti-*CD122/IL-2R $\beta$* , anticuerpo anti-*CD134/OX-40*, anticuerpo anti-*CD137/4-1BB*, anticuerpo anti-*CD152/CTLA-4*, anticuerpo anti-*CD154/CD40L*, anticuerpo anti-*CD279/PD-1*, anticuerpo anti-*GITR*, anticuerpo anti-*IL-10*, anticuerpo anti-*TGF $\beta$* , anticuerpo anti-*galectina-1*, anticuerpo anti-*Neuropilina/NRP*, anticuerpo anti-*TNFR2*, anticuerpo anti-*TGF $\beta$ R1*, anticuerpo anti-*G-protein-coupled receptor 83/GPR83* y anticuerpo anti-*HLA-DR*.

En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit segundo de la invención está marcado o inmovilizado. En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit segundo de la invención está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un sustrato de una enzima. En una realización preferida, al menos uno de los anticuerpos del kit segundo de la invención está inmovilizado en una matriz de nylon, en un soporte de plástico o en cuentas.

Teniendo en cuenta que es posible detectar la proteína *CD26* analizando su actividad dipeptidil peptidasa IV, en una realización preferida, el kit segundo de la invención además comprende al menos un reactivo que permite detectar la actividad dipeptidil peptidasa IV de la proteína *CD26*. La expresión "reactivo que permite detectar la actividad dipeptidil peptidasa IV de la proteína *CD26*", tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una molécula por la cual el enzima es muy específico (como por ejemplo, el dipéptido Ala-Pro en el caso de *CD26/DPP-IV*) y cuyo procesamiento genera una señal (fluorogénica, cromogénica, etc) de intensidad directamente proporcional a la actividad específica (cantidad) del enzima, o bien alternativamente que presenta características físico-químicas (por ejemplo, una nueva longitud de onda de emisión) que permiten diferenciarla de la señal procedente de la molécula sin procesar. Ejemplos de reactivos que pueden emplearse para detectar la actividad dipeptidil peptidasa IV son, por ejemplo, y sin limitarse, los sustratos cromogénicos glicil-L-prolil-p-nitroanilida (Gly-Pro-pNA) o glicil-L-prolil-3,5-dibromo-4-hidroxianilida (Gly-Pro-DBAP) (ambos combinados con espectrofotómetros), o el sustrato fluorogénico [Ala-Pro]<sup>2</sup>-violeta de cresilo (combinado con microscopía confocal o citometría de flujo).

El kit segundo de la invención puede contener además cualquier otro reactivo necesario para llevar a cabo el método de la invención como, por ejemplo, pero sin limitarse, controles positivos y/o negativos, tampones, agentes

para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, polimerasas, nucleótidos, etc. Además, el kit segundo de la invención puede incluir cualquier soporte y/o recipiente necesario para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit segundo de la invención comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

Un sexto aspecto de la presente invención, se refiere al uso del kit segundo de la invención para identificar células nTreg de una muestra biológica aislada. Preferiblemente, la muestra biológica proviene de un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad parasitaria.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama en el que se muestra una aplicación potencial del uso de CD26 en un protocolo de purificación magnética de células nTreg humanas mediante selección negativa.

Figura 2. Muestra que las células T reguladoras humanas naturales (nTreg) presentan una baja o nula expresión de CD26. La sangre fue marcada directamente con anticuerpos monoclonales específicos de CD4, CD25, CD26 (clon TP1/19) y CD127, siendo posteriormente lisados los eritrocitos, fijados los leucocitos y las muestras leídas en el citómetro. En el análisis posterior, la población de linfocitos CD4+ fue seleccionada en función de su tamaño y complejidad celular (R1; dispersión frontal de la luz vs dispersión lateral de la luz, respectivamente). Sobre esta, y en base a la expresión de CD4 y CD25, se establecieron 3 subpoblaciones (R2-R4); en cada una de ellas se midió la expresión extracelular de CD26 y CD127.

Figura 3. Muestra que el uso del fenotipo CD4+FoxP3+ es insuficiente por para delimitar las nTregs humanas en poblaciones de células T activadas. Las PBMCs fueron purificadas primero mediante gradiente de densidad en Ficoll, y o bien marcadas directamente (no activadas, día 0) o bien activadas durante 5 días en medio completo suplementado con 1 µg/ml PHA antes de proceder al marcaje con anticuerpos. En ambos casos, las células fueron inicialmente incubadas con anti-CD26 (clon TP1/16) y anti-CD4, ambos marcadores extracelulares, antes de ser fijadas/permeabilizadas y marcadas con el anticuerpo anti-FoxP3. Durante el análisis de los datos se seleccionaron primero los linfocitos en función de su tamaño/complejidad celular (R1; dispersión frontal de la luz vs dispersión lateral de la luz, respectivamente), y dentro de estos los CD4+ (R2). Posteriormente se identificaron las nTreg mediante el marcador FoxP3 (gráfica FoxP3-PE vs CD4-PerCP; 6,6% nTreg en no activadas vs 16,6% nTreg en activadas) o en combinación con CD26 (gráfica FoxP3-PE vs CD26-FITC; 8,8% nTreg en no activadas vs 13% nTreg en activadas).

Figura 4. Demuestra que la inclusión del marcador CD26 en el panel de marcadores CD4 y CD25 durante el proceso de selección/purificación de linfocitos nTreg humanos elimina la ambigüedad en su identificación derivada del uso del marcador CD25. Al igual que en la Figura 3, las PBMCs fueron purificadas y marcadas directamente (Figura 4, parte A: no activadas, día 0) o bien activadas con PHA (Figura 4, parte B: activadas, 5 días) antes del marcaje inmunofluorescente. Durante éste, las células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD4-PerCP, anti-CD25-APC y anti-CD26-FITC (clon TP1/16). Antes del marcaje con anti-FoxP3-PE, los linfocitos fueron previamente fijados y permeabilizados. Durante el análisis se seleccionó la población de linfocitos en base a su tamaño y complejidad (R1), y dentro de éstos las células CD4+ (R2). Para medir el porcentaje de células FoxP3+ (gráfica FoxP3-PE vs tamaño) se seleccionaron primeramente (gráfica CD26-FITC vs CD25-APC) aquellos linfocitos con fenotipo CD25+ (R6) o CD25+CD26- (R3). Tanto en PBMCs no activadas (Figura 4, parte A) como en activadas (Figura 4, parte B) la población CD4+CD25+ (R6) presenta un grupo de células T efectoras con bajos niveles de FoxP3 (R7), no existente dentro de los linfocitos CD4+CD25+CD26- (R3).

Figura 5. Demuestra que CD26, en comparación con CD49d, presenta diferencias más notables de expresión entre linfocitos nTreg (FoxP3+) y linfocitos efectoras (FoxP3<sup>débil/-</sup>), y además es un mejor marcador de células productoras de IFNγ. En la Figura 5, parte A, las PBMCs fueron purificadas y marcadas directamente (no activadas, día 0) o bien activadas con PHA durante 5 días (activadas) antes del marcaje inmunofluorescente. Los linfocitos fueron incubados con anticuerpos anti-CD4-PerCP, anti-CD26-FITC (TP1/16) y, alternativamente, anti-CD25-APC o anti-CD49d-APC. Posteriormente fueron fijados y permeabilizados antes del marcaje con anti-FoxP3-PE. Durante el análisis, se seleccionó la población de linfocitos (tamaño vs complejidad; R1), distinguiendo dentro de éstos dos subpoblaciones en base a CD4 y FoxP3: las nTreg CD4+FoxP3+ (R2) y los linfocitos efectoras CD4+FoxP3<sup>débil/-</sup> (R3). Finalmente, se analizó la expresión de CD25, CD26 y CD49d, en combinación con FoxP3, dentro de cada una de estas subpoblaciones (R2 y R3). Para facilitar la comparación, los linfocitos nTreg han sido representados en gris y las células efectoras en negro. En la Figura 5, parte B, las PBMCs fueron purificadas, activadas 5 días con PHA y tratadas durante 4 horas con BD GolgiStop<sup>TM</sup>. Los linfocitos fueron incubados con dos combinaciones de anticuerpos: anti-CD4-PerCP, anti-CD25-APC y anti-CD26-FITC (clon TP1/16), o bien anti-CD4-PerCP, anti-CD25-FITC y anti-CD49d-APC. Posteriormente fueron lavados, fijados y permeabilizados antes del marcaje con anti-IFNγ-PE. Durante la adquisición y análisis de los datos se seleccionó la población de linfocitos (tamaño vs complejidad; R1; no mostrado), y dentro de estos las

nTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (R2; no mostrado). Las figuras inferiores (CD4-PerCP vs IFN $\gamma$ -PE) indican, para dos donantes sanos (#1 y #2) la cantidad de células IFN $\gamma$ <sup>+</sup> dentro de las células nTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD26<sup>-</sup> (R3; 0,5% y 1,5%) o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup> (R5; 19,2% y 30,8%), así como los porcentajes de reducción de células IFN $\gamma$ <sup>+</sup> con respecto a la población original CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (R2) cuando se eliminan las células CD26<sup>+</sup> (96% $\downarrow$  y 82% $\downarrow$ ) o CD49d<sup>+</sup> (0% $\downarrow$  y 10% $\downarrow$ ).

5

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

10

### Ejemplo 1

15

#### *Identificación de células nTreg humanas empleando el marcador CD26*

##### *Materiales y métodos*

20

##### *1. Materiales*

La fitohemaglutinina (PHA), el paraformaldehído (PFA), la solución de penicilina-estreptomomicina y el medio de cultivo RPMI-1640 fueron obtenidos de Sigma, el suero bovino fetal (FBS) de Biowhittaker (Lonza) y el Ficoll-Paque PLUS de GE Healthcare. Los anticuerpos de ratón frente a las moléculas humanas CD127 (anti-CD127-PE, IgG1, clon hIL-7R-M21), CD25 (anti-CD25-FITC, y anti-CD25-APC, ambos IgG1, clon M-A251), CD49d (anti-CD49d-APC, IgG1, clon 9F10), FoxP3 (anti-FoxP3-PE, IgG1, clon 259D/C7) e IFN $\gamma$  (anti-IFN $\gamma$ -PE, IgG1, clon B27), así como el control isotípico IgG1-APC (clon X40) de ratón, son de BD Pharmingen (BD Biosciences). Los anticuerpos de ratón frente a las moléculas humanas CD4 (CD4-PerCP, IgG1, clon SK3) y CD26 (CD26-FITC, IgG2a, clon L272) son de BD Immunocytometry Systems (BD Biosciences). El anticuerpo de ratón frente a CD26 humano, clon TP1/16, fue purificado en nuestro laboratorio a partir de un sobrenadante de hibridoma y posteriormente marcado con FITC (*Fluorotag FITC Conjugation Kit*, Sigma). El anticuerpo murino frente a CD26 humano (CD26-FITC, IgG2b, clon TP1/19) fue proporcionado por Immunostep (Salamanca, España). Los isotipos IgG1-FITC (clon MOPC-21) e IgG1-PE (clon MOPC-21) fueron comprados a Sigma. Los tampones utilizados para la tinción intracelular de FoxP3 e IFN $\gamma$  fueron *BD Pharmingen stain buffer*, *BD FACS 10x lysing buffer* y *Human FoxP3 buffer set*, *BD Cytotfix/Cytoperm buffer*, y *BD Perm/Wash*<sup>TM</sup>, todos de BD Biosciences.

35

##### *2. Métodos*

40

##### *Purificación y cultivo de PBMCs*

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas a partir de concentrados leucocitarios del Centro de Transfusión de Galicia (Santiago de Compostela) mediante purificación en gradientes de Ficoll<sup>®</sup> y utilizados inmediatamente (PBMCs) o bien cultivados a 37°C en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en presencia de 1  $\mu$ g/ml PHA (fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*) durante 5 días para transformarlas en PBMCs activadas (también denominadas blastos o linfoblastos); en los ensayos de medición del porcentaje de células productoras de IFN $\gamma$  (Figura 5, parte B), el medio de cultivo fue suplementado con una dilución 1/1000 de *GolgiPlug*<sup>TM</sup> (BD Biosciences) durante las últimas 4 horas de cultivo. En todos los experimentos el medio de cultivo empleado fue RPMI-1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 100  $\mu$ g/ml de estreptomomicina y 100 UI/ml de penicilina, y la concentración celular de partida fue siempre de 1x10<sup>6</sup> PBMC/ml.

50

##### *Marcaje inmunofluorescente de marcadores extracelulares en linfocitos de sangre no fraccionada*

55

Para estos experimentos (Figura 2, leucocitos sin fraccionar) se añadió primero por tubo la cantidad correspondiente de anticuerpo: isotipo-FITC, isotipo-PE o isotipo-APC (por separado) para los controles negativos de marcaje, y anti-CD26-FITC (TP1/19), anti-CD127-PE, anti-CD4-PerCP o anti-CD25-APC (todos juntos para el fenotipado, o bien por separado para las compensaciones). El volumen usado por tubo de cada anticuerpo fue el indicado por el fabricante. A continuación se depositaron 100  $\mu$ l de sangre completa anticoagulada (tubos K3E, BD vacutainer), se mezcló bien con los anticuerpos y se incubó 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente (RT). Tras ese tiempo se lisaron los eritrocitos añadiendo 2 ml por tubo de *1X BD FACS lysing solution* e incubando en oscuridad a RT durante 15 minutos. Finalizada ésta, las muestras se centrifugaron a 200 xg (5 min, RT) y se eliminó el sobrenadante. A continuación las células del tubo se lavaron con 2 ml de solución de lavado (PBS pH 7,4, 1% suero bovino fetal/FBS, 0,1% Azida sódica), repitiendo la centrifugación a 200 xg (5 min, RT). Descartado el sobrenadante, las células fueron fijadas (1 ml de 2% paraformaldehído/PFA en PBS pH 7,4, frío) durante 30 min a RT. Para parar la fijación se lavaron los leucocitos con 2 ml por tubo de solución de lavado, centrifugando a 200 xg (5 min, RT), descartando el sobrenadante y resuspendiendo en 1 ml de solución de lavado.

65

## ES 2 363 545 B2

### *Marcaje inmunofluorescente de marcadores extracelulares e intracelulares en PBMCs y blastos*

Para detectar simultáneamente por inmunofluorescencia tanto proteínas extracelulares (CD4, CD25, CD26, CD49d) como intracelulares (FoxP3) se llevó a cabo el siguiente protocolo [Figuras 3, 4 (parte A y B) y 5 (parte A)]. Tanto las PBMCs como los blastos (PHA 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5 días) fueron lavados con *BD Pharmingen Stain Buffer*, contabilizados empleando un hemocitómetro y ajustados a una concentración de  $10 \times 10^6$  células/ml con el mismo tampón. Para el marcaje extracelular se depositó en los tubos de citometría volúmenes adecuados (de acuerdo con el fabricante) del isotipo-FITC o isotipo-APC (controles negativos extracelular) o bien de los anticuerpos específicos (anti-CD26-FITC TP1/16, anti-CD4-PerCP, anti-CD25-APC, anti-CD49d-APC); todos juntos, para el fenotipado, o bien por separado, para las compensaciones). A continuación,  $1 \times 10^6$  células (100  $\mu\text{l}$ ) fueron depositadas en cada tubo de citometría y el marcaje se produjo durante 20 min a RT y en oscuridad. Tras un lavado con 2 ml de *BD Pharmingen Stain Buffer* por tubo, las células fueron centrifugadas a 250 xg 10 min RT. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron fijadas con 2 ml por tubo de *1x Human FoxP3 buffer A* durante 10 min a RT en oscuridad. Tras una centrifugación a 500 xg 5 min RT, el exceso de líquido fue eliminado y el proceso de lavado y centrifugación repetido una vez más. Las células así fijadas fueron permeabilizadas con 0,5 ml/tubo de *1x Human FoxP3 buffer C* (dilución 1:50 de *Human FoxP3 buffer B en 1x Human FoxP3 buffer A*) durante 30 min a RT en oscuridad. Las células se lavaron con 2 ml de *BD Pharmingen Stain Buffer* y fueron centrifugadas a 500 xg (5 min, RT). El sobrenadante fue eliminado y el proceso de lavado repetido. Permeabilizada la membrana plasmática, las células se incubaron durante 30 minutos (RT, oscuridad) bien con isotipo-PE (control isotópico intracelular; por separado) o con anti-FoxP3-PE (por separado, para la compensación, o en combinación con los anticuerpos -ya unidos a las células- anti-CD26-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD25-APC y anti-CD49d-APC para el fenotipado). Las células fueron lavadas con 2 ml de *BD Pharmingen Stain Buffer*, centrifugadas a 500 xg (5 min, RT) y fijadas en 1 ml de 2% PFA por 30 min a RT (oscuridad). Tras un último lavado con 2 ml de *BD Pharmingen Stain Buffer*, se resuspendieron los leucocitos en 1 ml del mismo tampón.

Para evaluar el porcentaje de linfoblastos productores de IFN $\gamma$  (Figura 5, parte B) se utilizó también un protocolo comercial (*BD Cytotfix/Cytoperm™ PLUS Fixation/Permeabilization kit with BD GolgiPlug™*) muy similar al anterior, en el que las células fueron marcadas extracelularmente con diversas combinaciones de los anticuerpos isotópicos (isotipo-FITC, isotipo-APC) o específicos (anti-CD26-FITC TP1/16, anti-CD25-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD49d-APC y anti-CD25-APC). Una vez lavadas dos veces con 1 ml de *BD Pharmingen Stain Buffer*, las células fueron fijadas y permeabilizadas durante 20 minutos a 4°C con 250  $\mu\text{l}$  de *BD Cytotfix/Cytoperm buffer*, y lavadas dos veces con 1 ml de *1x BD Perm/Wash™*. La incubación con anti-IFN $\gamma$ -PE (o con isotipo-PE como control negativo) se realizó en 50  $\mu\text{l}$  de *1x BD Perm/Wash™* durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con 1 ml de *1x BD Perm/Wash™* y resuspendidas en 1 ml de *BD Pharmingen Stain Buffer*.

La adquisición de todos los datos de citometría se realizó en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences), y su análisis se llevó a cabo con el software WinMDI, un paquete de software libre proporcionado por el Dr Joe Trotter (The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility).

### 40 *Resultados*

En la Figura 2 (leucocitos de sin fraccionar y sin activar), se demuestra que las células nTreg expresan bajos niveles de CD26 en sangre procedente de donantes sanos. Los linfocitos T CD4+ con mayores niveles de CD25 (R2), y por lo tanto células nTreg, son los que tienen menores cantidades de CD127 y CD26 en la superficie celular. En cambio, los mayores niveles de CD127 y CD26 se corresponden con las células efectoras CD4+CD25- (R4); la población de células CD4+ con niveles intermedios de CD25 (R3) comprende tanto células nTreg (CD26- y CD127-) como células T efectoras (CD26+ y CD127+). Estos mismos resultados han sido obtenidos con tres anticuerpos monoclonales anti-CD26 distintos (TP1/19, Figura 2; TP1/16, Figura 5, parte A; L272, no mostrado), lo que indica que no se trata de un epítipo en concreto, sino que existe una reducción real de la molécula CD26 en la superficie de las células nTreg.

En linfocitos en reposo, el  $5,3 \pm 2,2\%$  (n=10) de todas las células CD4+ sin activar son CD25+. En el sistema murino el 100% de estas células CD25+ serían consideradas células nTreg, pero dicha asunción es incorrecta en el sistema humano, ya que solamente aquellas con niveles muy elevados de CD25 (población R2, pero no R3, en Figura 2) pueden ser consideradas como verdaderas células nTreg (100% FoxP3+); por lo tanto, el porcentaje de células nTreg con fenotipo CD25+FoxP3+ dentro de las CD4+ es incluso menor de un 5%. Dentro de estas nTreg CD4+CD25+, nuestros datos indican que el  $81,9 \pm 11,2\%$  (n=10) tienen un fenotipo CD4+CD25+CD26-CD127-.

Dado que CD25, a diferencia de CD4, es un marcador que muestra una expresión continua, la definición de la subpoblación que expresa los mayores niveles de CD25 no está exenta de arbitrariedad e inconsistencia de experimento a experimento. Además, y como se muestra en la Figura 2, las células CD4+ que expresan bajos niveles de CD25 (e incluso las CD25-) también contienen células CD4+FoxP3+; es decir, nTreg. Por tanto, se necesita de un marcador adicional que nos separe, dentro de las células CD25+, aquellas que sean verdaderas células nTreg de las que no lo son.

Un buen marcador de nTreg es FoxP3, si bien es una proteína intracelular. En la Figura 3 (células mononucleares de sangre periférica, PBMCs) se muestra como un 6,6% de los linfocitos T CD4+ expresan este factor de transcripción, y por lo tanto son células nTreg; sin embargo, el proceso de activación celular con fitohemaglutinina (PHA), que simula una respuesta inflamatoria, incrementa este porcentaje de células nTreg hasta un “falso” 16,6%, fruto de la aparición

## ES 2 363 545 B2

de células T que expresan transitoriamente niveles intermedios de FoxP3, pero que en realidad no son “verdaderas” células nTreg, sino células T efectoras activadas. En cambio, cuando la estimación de dicho porcentaje de células nTreg se hace en función de FoxP3 y CD26 simultáneamente los resultados son más fiables (8,8% no activadas vs 13% activadas), debido al hecho de que las células T efectoras activadas tienen el fenotipo FoxP3+ CD26+, mientras que las células nTreg son FoxP3+ CD26-. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando los cultivos de células activadas con PHA fueron estimulados adicionalmente con una citoquina proinflamatoria y presente en las respuestas TH1: IL-12.

En la figura 4 se demuestra como CD26 permite distinguir las células nTreg CD4+FoxP3+ dentro de la población de células CD4+CD25+, lo que convierte a CD26 es un útil marcador adicional a CD25. En la primera parte de la figura 4 (no activadas, día 0) se observa que las células nTreg seleccionadas en función de los marcadores CD4 y CD25 (R6) presentan un 93% de células FoxP3+, mientras que las células nTreg seleccionadas empleando los marcadores CD4, CD25 y CD26 (R3) presentan una riqueza aún mayor (95%) en células FoxP3+. Más importante, sin embargo, es que dentro de las células nTreg CD4+CD25+ (R6) hay una proporción apreciable de células con niveles bajos de FoxP3 (es decir, células T efectoras), algo prácticamente inexistente en las células CD4+CD25+CD26- (R3). En este mismo sentido, en la segunda parte de la Figura 4 (PBMCs activadas, PHA 5 días) se pone de manifiesto nuevamente cómo las células nTreg seleccionadas en función exclusivamente de los marcadores CD4 y CD25 (R6) presentan un 97,8% de riqueza en células FoxP3+, un porcentaje prácticamente idéntico (98,1% FoxP3+) a las células nTreg seleccionadas empleando los marcadores CD4, CD25 y CD26 (R3). No obstante, la misma figura muestra además la persistencia de una proporción significativa de células con bajos niveles de FoxP3 (células T efectoras) dentro de las células nTreg CD4+CD25+ (R6), una subpoblación francamente disminuida dentro de las células nTreg CD4+CD25+CD26- (R3; Figura 4, parte A y B) o CD4+CD25+CD49d- (no mostrado). Sin embargo, a diferencia de este último marcador, CD49d, CD26 presenta diferencias más notables de expresión al comparar linfocitos nTreg (FoxP3+) y linfocitos efectoras (FoxP3débil/-) (Figura 5, parte A), y también parece ser un mejor criterio de eliminación de células productoras de IFN $\gamma$  dentro de las nTreg CD4+CD25+ (Figura 5, parte B).

En conclusión, los datos presentados en las Figuras 3, 4 y 5 permiten afirmar que el criterio CD4+CD25+CD26- en los protocolos de purificación celular daría acceso a poblaciones de células nTreg altamente puras y libres de células T efectoras productoras de IFN $\gamma$ , sin necesidad incluso de emplear el fenotipo fuertemente subjetivo CD25<sup>fuerte</sup>, permitiendo así recuperar el ~60-70% de las células nTreg iniciales (un cierto porcentaje se perderá debido a la existencia de células CD4+FoxP3+ que se escapan al proceso de selección al ser bien CD25<sup>-</sup> o CD26<sup>débil</sup>).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para diferenciar y aislar células T reguladoras naturales (nTreg) de una muestra biológica aislada en la que los linfocitos T efectores están activados, que comprende las siguientes etapas:
- a) tratar dicha muestra biológica con un anticuerpo anti-CD25 y con un anticuerpo anti-CD26, y
  - b) separar las células nTreg.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde en la etapa (a) la muestra biológica se trata además con un anticuerpo anti-CD127 y/o con un anticuerpo anti-CD49d.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, donde en la etapa (b) se lleva a cabo la eliminación de las células CD25- y CD26+ de la muestra biológica.
4. Método según la reivindicación 2, donde en la etapa (b) se lleva a cabo la eliminación de las células:
- CD127+ cuando en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD127, y/o
  - CD49d+ cuando en la etapa (a) la muestra biológica se trata con un anticuerpo anti-CD49d.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde en la etapa (b) se eliminan de la muestra biológica las células que no son T CD4+.
6. Método según la reivindicación 5, donde en la etapa (a) además se trata la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD4.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde en la etapa (a) además se trata la muestra biológica con al menos un anticuerpo que reconoce una molécula presente en células que no son T CD4+.
8. Método según la reivindicación 7, donde en la etapa (a) se trata la muestra biológica con al menos un anticuerpo que reconoce una molécula presente en células que no son T CD4+ seleccionado de la lista que comprende: anti-  
35 cuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD11b/Mac1, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD41a, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-CD235a y anticuerpo anti- $\gamma\delta$ TCR, o cualquiera de sus combinaciones.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde en la etapa (a) se trata la muestra biológica con al menos un anticuerpo anti-CD45RO o un anticuerpo anti-CD45RA.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está marcado.
- 45 11. Método según la reivindicación 10, donde al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminescente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un sustrato de una enzima.
- 50 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está inmovilizado.
13. Método según la reivindicación 12, donde al menos uno de los anticuerpos empleados en la etapa (a) está inmovilizado en un soporte seleccionado de la lista que comprende: una matriz de nylon, en un soporte de plástico o en cuentas.
- 55 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la etapa (b) se lleva a cabo mediante al menos un método seleccionado de la lista que comprende: centrifugación, *fluorescence activated cell sorting/FACS*, *cell elutriation*, separación magnética celular, separación inmunológica basada en columna, adhesión celular, lisis mediante complemento o citometría de flujo, o cualquiera de sus combinaciones.
- 60 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la muestra biológica se selecciona de la lista que comprende: bazo, timo, ganglio linfático, médula ósea, placa de Peyer, amígdala, fluido sinovial, linfa, líquido cefalorraquídeo, orina, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido amniótico, exudado, sangre, concentrado leucocitario, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica o líneas celulares.
- 65

## ES 2 363 545 B2

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 donde la muestra biológica proviene de un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad parasitaria.
- 5 17. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 que comprende un anticuerpo anti-CD25 y un anticuerpo anti-CD26.
18. Kit según la reivindicación 17, que además comprende un anticuerpo anti-CD127, y/o un anticuerpo anti-CD49d.
- 10 19. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, que además comprende un anticuerpo anti-CD4.
20. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que además comprende al menos un anticuerpo que reconoce una molécula presente en células que no son T CD4+.
- 15 21. Kit según la reivindicación 20, donde el anticuerpo que reconoce una molécula presente en células que no son T CD4+ se selecciona de la lista que comprende: anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD11b/Mac1, anticuerpo anti-CD14, anticuerpo anti-CD16, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-CD36, anticuerpo anti-CD41a, anticuerpo anti-CD56, anticuerpo anti-CD123, anticuerpo anti-CD235a o anticuerpo anti- $\gamma\delta$ TCR.
- 20 22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, que además comprende un anticuerpo anti-CD45RO y/o un anticuerpo anti-CD45RA.
23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, donde al menos uno de dichos anticuerpos está marcado.
- 25 24. Kit según la reivindicación 23, donde al menos uno de los anticuerpos está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima y un sustrato de una enzima.
- 30 25. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, donde al menos uno de los anticuerpos está inmovilizado.
26. Kit según la reivindicación 25, donde al menos uno de los anticuerpos está inmovilizado en un soporte seleccionado de la lista que comprende: una matriz de nylon, un soporte de plástico o cuentas.
- 35 27. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, que además comprende al menos un elemento necesario para la separación de células mediante un método seleccionado de la lista que comprende: centrifugación, separación celular activada por fluorescencia/FACS, separación magnética celular, separación inmunológica basada en columna, adhesión celular o lisis mediante complemento.
- 40 28. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, que además comprende al menos un elemento seleccionado de la lista que comprende: columnas, soportes de columnas, tubos de recolección de fracciones, imanes, tamices para eliminar los agregados celulares, soluciones que contengan factores de complemento, soluciones isotónicas de lavado, soluciones de separación/enriquecimiento celular, cuentas superparamagnéticas, placas o soportes de plástico con anticuerpos u otras moléculas unidas, componentes que permitan la eliminación de las células muertas antes del proceso de purificación, soluciones para la exclusión de las células muertas durante la evaluación por citometría de flujo de la pureza de las nTregs una vez aisladas, anticuerpos unidos a fluorocromos para evaluar por citometría de flujo la pureza de las nTreg una vez purificadas o soluciones de permeabilización celular para evaluar por citometría de flujo la pureza de las nTreg una vez purificadas.
- 45 29. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28 para aislar células nTreg de una muestra biológica aislada.
- 50 30. Uso del kit según la reivindicación 29, donde la muestra biológica proviene de un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad parasitaria.
- 55 31. Método para diferenciar células nTreg de linfocitos T efectores activados en una muestra biológica aislada, que comprende las siguientes etapas:
- 60 a) detectar en la muestra biológica el producto de expresión del gen *CD25* y del gen *CD26*.
- b) comparar la cantidad del producto de expresión de los genes detectada en la etapa (a) con una cantidad de referencia, y
- 65 c) asignar la comparación realizada en la etapa (b) a la identificación de las células nTreg, cuando la cantidad del producto de expresión del gen *CD26* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD26*, y cuando la cantidad del producto de expresión del gen *CD25* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD25*.

## ES 2 363 545 B2

32. Método según la reivindicación 31, donde en la muestra biológica de la etapa (a) además se detecta el producto de expresión del gen *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*, o cualquiera de sus combinaciones y en la etapa (c) se asigna la comparación realizada en la etapa (b) a la identificación de las células nTreg, cuando además,

- 5
- la cantidad del producto de expresión del gen *FoxP3* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *FoxP3*, o
  - la cantidad del producto de expresión del gen *CD127* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD127*, o
  - la cantidad del producto de expresión del gen *CD49d* detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia para el gen *CD49d* o
- 10
- 15 cualquiera de sus combinaciones.

33. Método según la reivindicación 32, donde en la etapa (a) se detecta la expresión de los genes *CD25*, *CD26* y *FoxP3*, y en la etapa (c) se asigna la comparación realizada en la etapa (b) a la identificación de las células nTreg cuando se detectan las cantidades de producto definidas para *CD25*, *CD26* y *FoxP3*.

34. Método según la reivindicación 32, donde en la etapa (a) se detecta la expresión de los genes *CD25* y *CD26* y además *CD127* y/o *CD49d*, y en la etapa (c) se asigna la comparación realizada en la etapa (b) a la identificación de las células nTreg cuando se detectan las cantidades de producto definidas para *CD25* y *CD26* y además para *CD127* y/o *CD49d*.

35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34 donde en la etapa (a) además se detecta la cantidad del producto de la expresión del gen *CD4*, y en la etapa (c) se asigna la comparación realizada en la etapa (b) a la identificación de las células nTreg, cuando además la cantidad del producto de expresión del gen *CD4* detectada es significativamente mayor que la cantidad de referencia para el gen *CD4*.

36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35 donde en la etapa (a) además se detecta la cantidad del producto de la expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *TCR $\alpha\beta$* , *CD3*, *CD5*, *CD11a/LFA-1*, *CD27*, *CD28*, *CD30*, *CD31*, *CD38*, *CD39*, *CD44*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD45RC*, *CD54/ICAM-1*, *CD57*, *CD58*, *CD62L/L-selectina*, *CD62P/P-selectina*, *CD71*, *CD73*, *CD83*, *CD80*, *CD86*, *CD95/Fas/APO-1*, *CD101*, *CD103*, *CD122/IL-2R $\beta$* , *CD132*, *CD134/OX-40*, *CD137/4-1BB*, *CD152/CTLA-4*, *CD154/CD40L*, *CD223/LAG-3*, *PD-1*, *PD-L1*, *GITR*, *IL-10*, *TGF $\beta$* , *galectina-1*, *Neuropilina/NRP*, *Neopterin*, *TNFR2*, *TGF $\beta$ RI*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83*, *HLA-DR*, *ICOS*, *GARP*, *FR4*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR8*, *CRTH2*, *CCR7*, *CCR4*, *CCR8*, *CCR5*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CLA*, *granzima A* o *granzima B*.

37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, donde el producto de la expresión de los genes detectada en la etapa (a) es el ARNm.

38. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 37, donde el producto de la expresión de los genes detectada en la etapa (a) es la proteína.

39. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 38, donde la muestra biológica se selecciona de la lista que comprende: bazo, timo, ganglio linfático, médula ósea, placa de Peyer, amígdala, fluido sinovial, linfa, líquido cefalorraquídeo, orina, fluido pleural, fluido pericárdico, fluido peritoneal, fluido amniótico, exudado, sangre, concentrado leucocitario, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos de sangre periférica o líneas celulares.

40. Método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 39 donde la muestra biológica proviene de un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad parasitaria.

41. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 40 que comprende los elementos necesarios para detectar en una muestra biológica el producto de la expresión del gen *CD25* y del gen *CD26*, donde dichos elementos se seleccionan de entre:

- 60
- una sonda, un cebador o un anticuerpo que permite detectar el producto de expresión del gen *CD25* y del gen *CD26* respectivamente, o
  - un reactivo que permite detectar la actividad dipeptidil peptidasa IV de la proteína *CD26*, o
  - cualquiera de sus combinaciones.
- 65

42. Kit según la reivindicación 41, que además comprende los elementos necesarios para detectar en una muestra biológica el producto de la expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *FoxP3*,

## ES 2 363 545 B2

*CD127* o *CD49d*, o cualquiera de sus combinaciones, donde dichos elementos se seleccionan de entre una sonda, un cebador o un anticuerpo que permite detectar, respectivamente, el producto de expresión de al menos un gen seleccionado de la lista que comprende: *FoxP3*, *CD127* o *CD49d*, o cualquiera de las combinaciones de dichos elementos.

5 43. Kit según la reivindicación 42, que comprende los elementos necesarios para detectar en una muestra biológica el producto de la expresión de los genes *CD25*, *CD26* y *FoxP3*, donde dichos elementos se seleccionan de entre una sonda, un cebador o un anticuerpo que permite detectar, respectivamente, el producto de expresión de los genes *CD25*, *CD26* y *FoxP3*, o cualquiera de las combinaciones de dichos elementos.

10 44. Kit según la reivindicación 42, que comprende los elementos necesarios para detectar en una muestra biológica el producto de la expresión de los genes *CD25* y *CD26*, y además, de los genes *CD127* y/o *CD49d*, donde dichos elementos se seleccionan de entre una sonda, un cebador o un anticuerpo que permite detectar, respectivamente, el producto de expresión de los genes *CD25* y *CD26*, y además, de los genes *CD127* y/o *CD49d*, o cualquiera de las combinaciones de dichos elementos.

15 45. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 44 que además comprende una sonda, un cebador o un anticuerpo que permite detectar el producto de expresión del gen *CD4*.

20 46. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45 que además comprende una sonda, un cebador o un anticuerpo que permite detectar el producto de expresión de al menos un gen seleccionado de la lista que comprende: *TCR $\alpha\beta$* , *CD3*, *CD5*, *CD11a/LFA-1*, *CD27*, *CD28*, *CD30*, *CD31*, *CD38*, *CD39*, *CD44*, *CD45RA*, *CD45RB*, *CD45RO*, *CD45RC*, *CD54/ICAM-1*, *CD57*, *CD58*, *CD62L/L-selectina*, *CD62P/P-selectina*, *CD71*, *CD73*, *CD83*, *CD80*, *CD86*, *CD95/Fas/APO-1*, *CD101*, *CD103*, *CD122/IL-2R $\beta$* , *CD132*, *CD134/OX-40*, *CD137/4-1BB*, *CD152/CTLA-4*, *CD154/CD40L*, *CD223/LAG-3*, *PD-1*, *PD-L1*, *GITR*, *IL-10*, *TGF $\beta$* , *galectina-1*, *Neuropilina/NRP*, *Neopterin*, *TNFR2*,  
25 *TGF $\beta$ R1*, *G-protein-coupled receptor 83/GPR83*, *HLA-DR*, *ICOS*, *GARP*, *FR4*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR8*, *CRTH2*, *CCR7*, *CCR4*, *CCR8*, *CCR5*, *CXCR4*, *CXCR5*, *CLA*, *granzima A* o *granzima B*.

47. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 46, donde al menos uno de los anticuerpos está marcado.

30 48. Kit según la reivindicación 47, donde al menos uno de los anticuerpos está marcado con una etiqueta seleccionada de la lista que comprende: un radioisótopo, un marcador fluorescente o luminiscente, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una etiqueta de afinidad, una enzima o un sustrato de una enzima.

35 49. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 48, donde al menos uno de los anticuerpos está inmovilizado.

50. Kit según la reivindicación 49, donde al menos uno de los anticuerpos está inmovilizado en un soporte seleccionado de la lista que comprende: una matriz de nylon, un soporte de plástico o cuentas.

40 51. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 50, que además comprende al menos un elemento seleccionado de la lista que comprende controles positivos y/o negativos, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, polimerasas, nucleótidos, soportes, recipientes o instrucciones.

45 52. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 51 para diferenciar células nTreg de linfocitos T efectores activados en una muestra biológica aislada.

53. Uso del kit según la reivindicación 52, donde la muestra biológica proviene de un sujeto con una enfermedad autoinmune, una enfermedad alérgica, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa o una enfermedad parasitaria.

50 54. Método para purificar células nTreg de una muestra biológica aislada en la que los linfocitos T efectores están activados, que comprende:

a. tratar una población de células CD25+ con un anticuerpo anti-CD26, y

55 b. seleccionar las células CD26- de la población celular anterior.

60 55. Método según la reivindicación 54, que además en la etapa (a) comprende tratar la población de células con anticuerpo anti-CD127 y/o con un anticuerpo anti-CD49d, y en el apartado (b) se seleccionan las células CD127- y/o CD49d-.

65

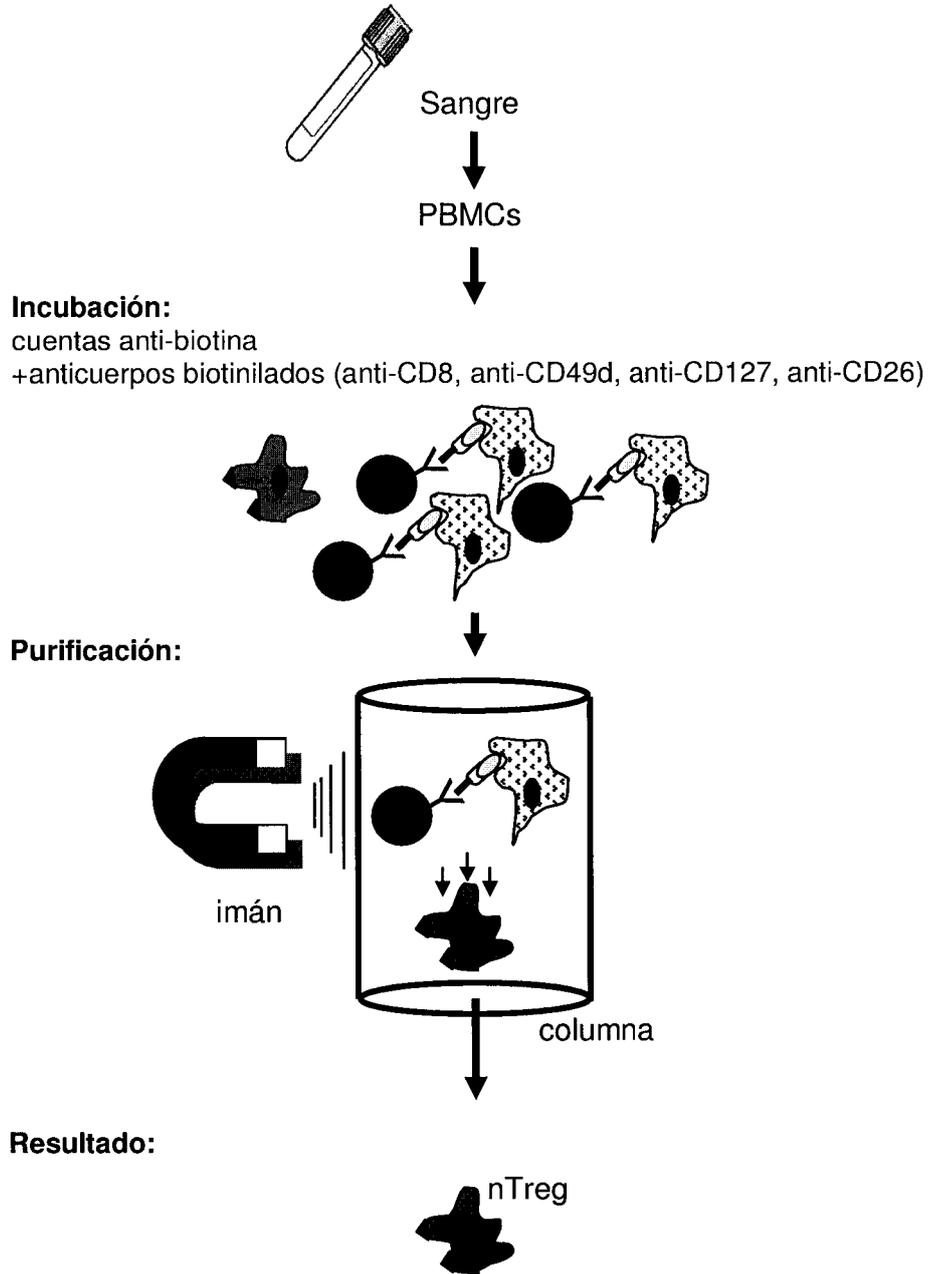


Figura 1

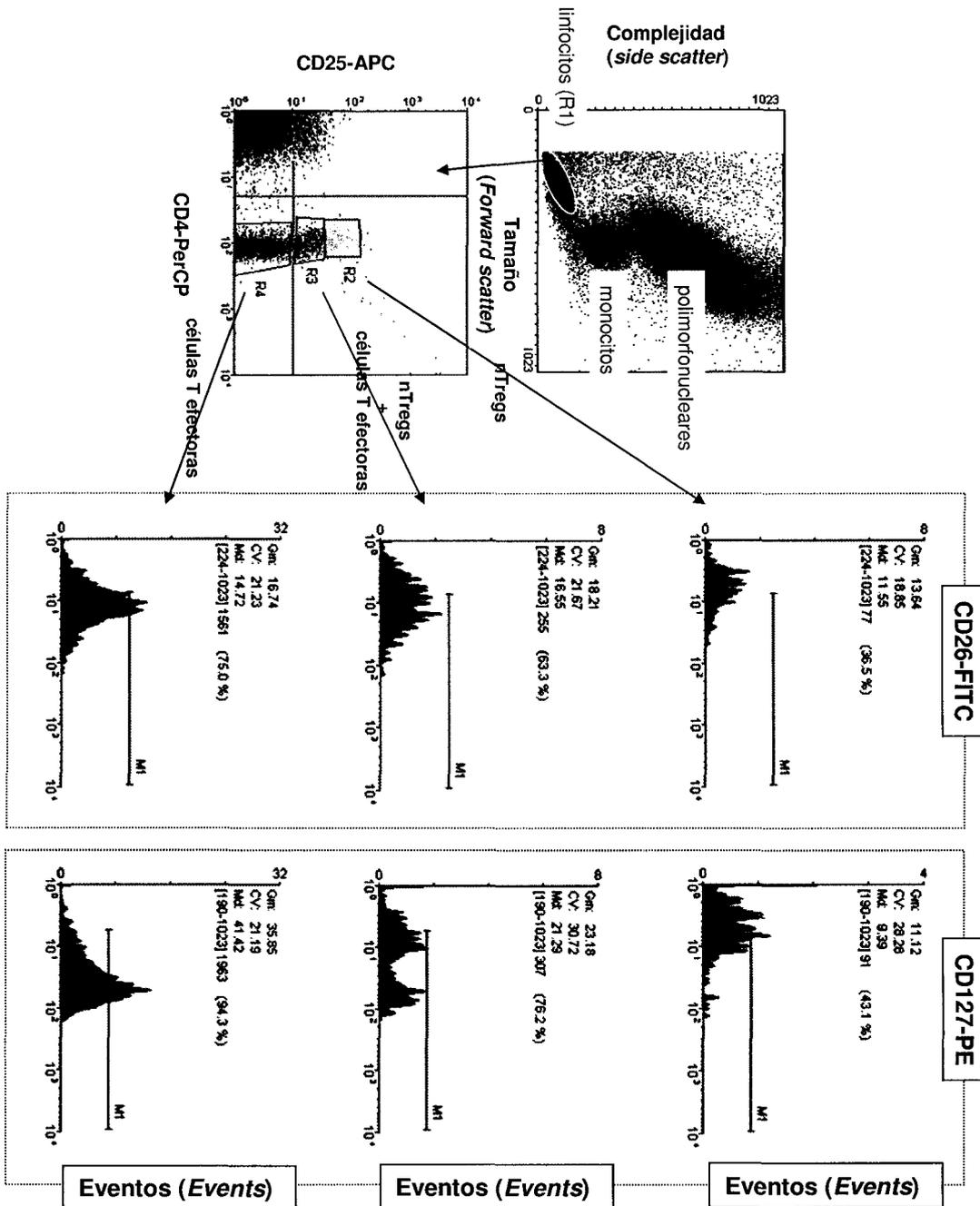


Figura 2

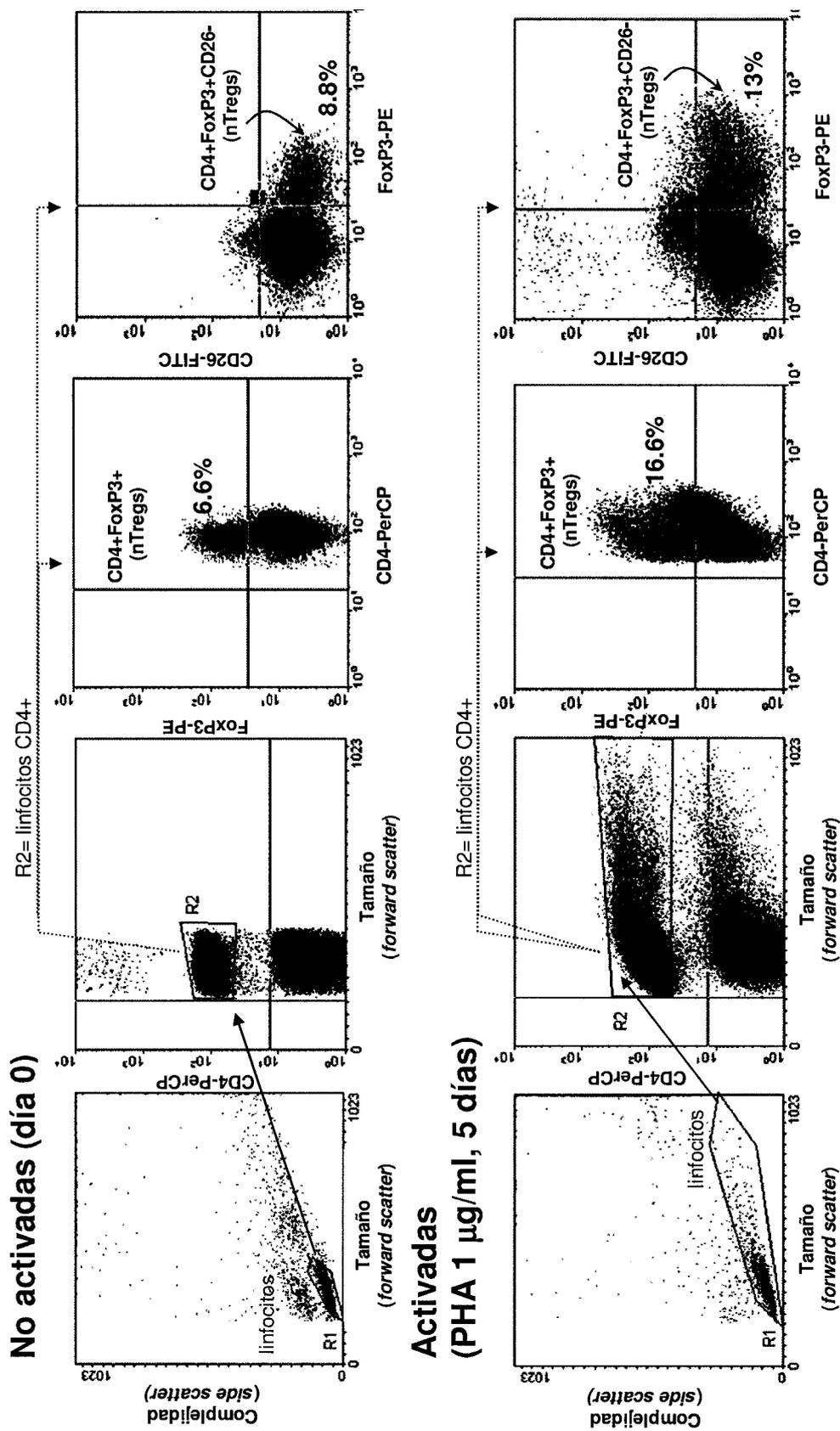


Figura 3

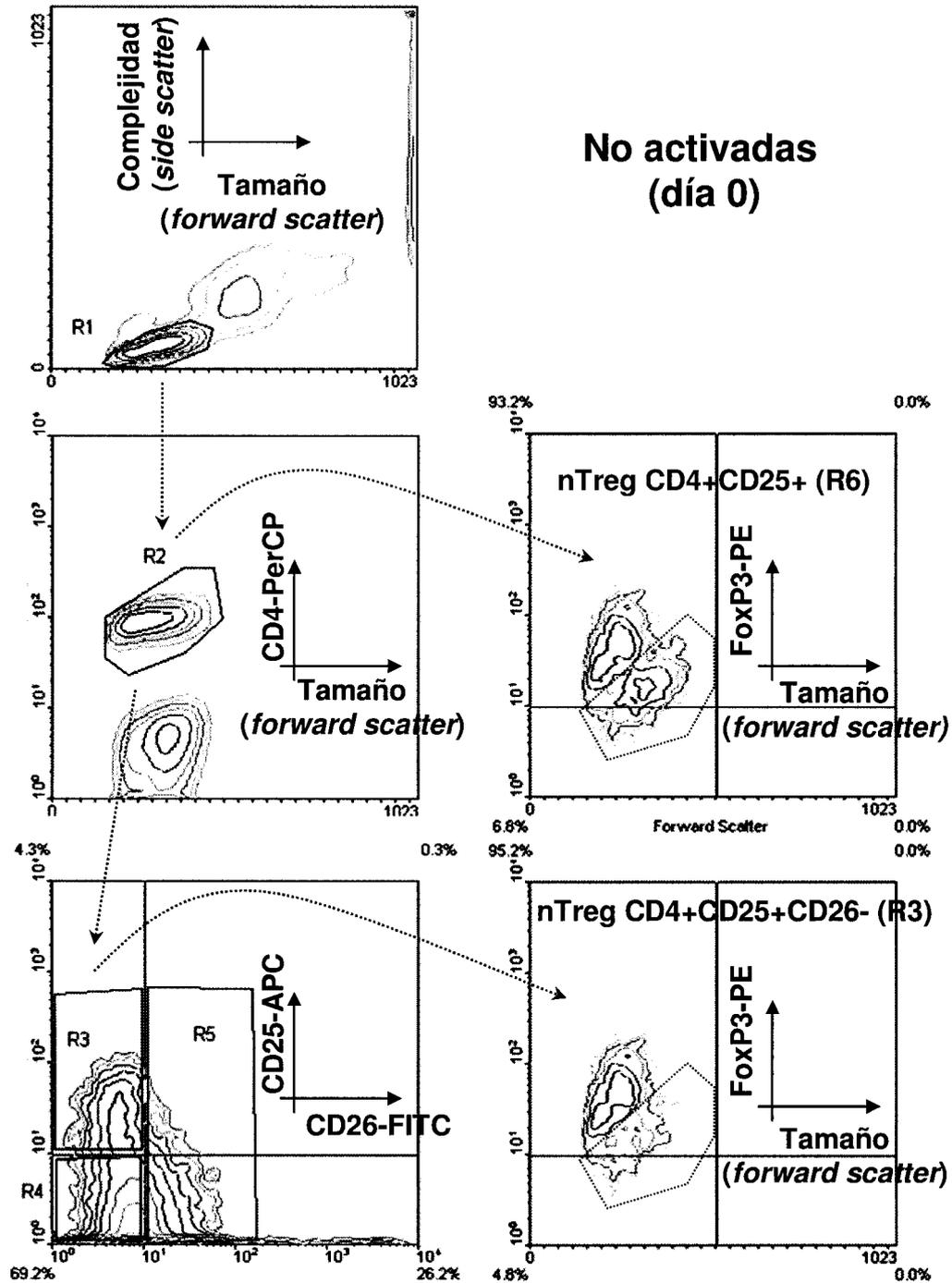
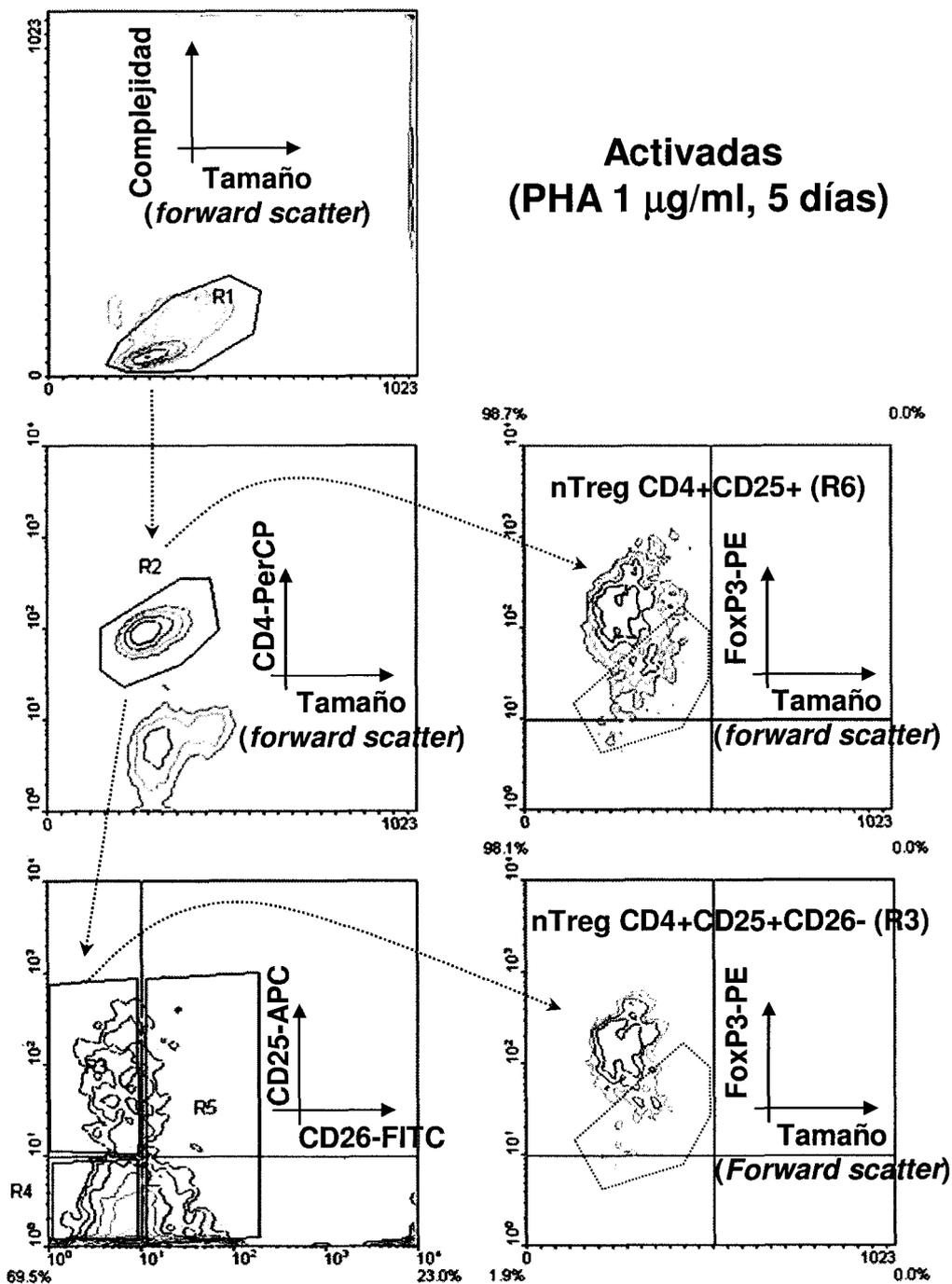
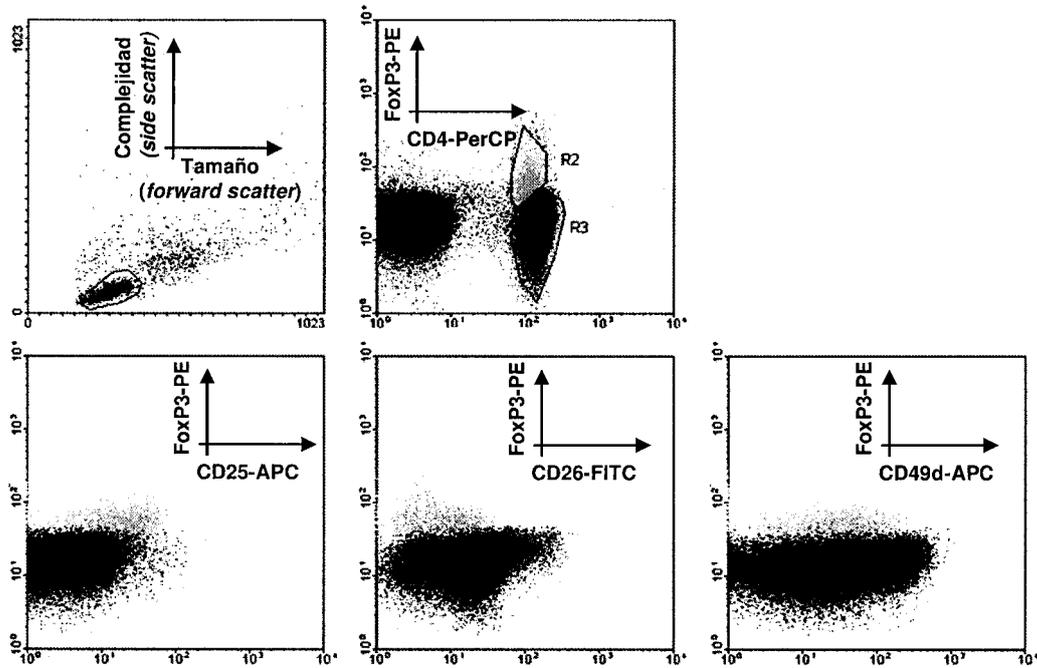


Figura 4A



**Figura 4B**

No activadas



Activadas (PHA 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5 días)

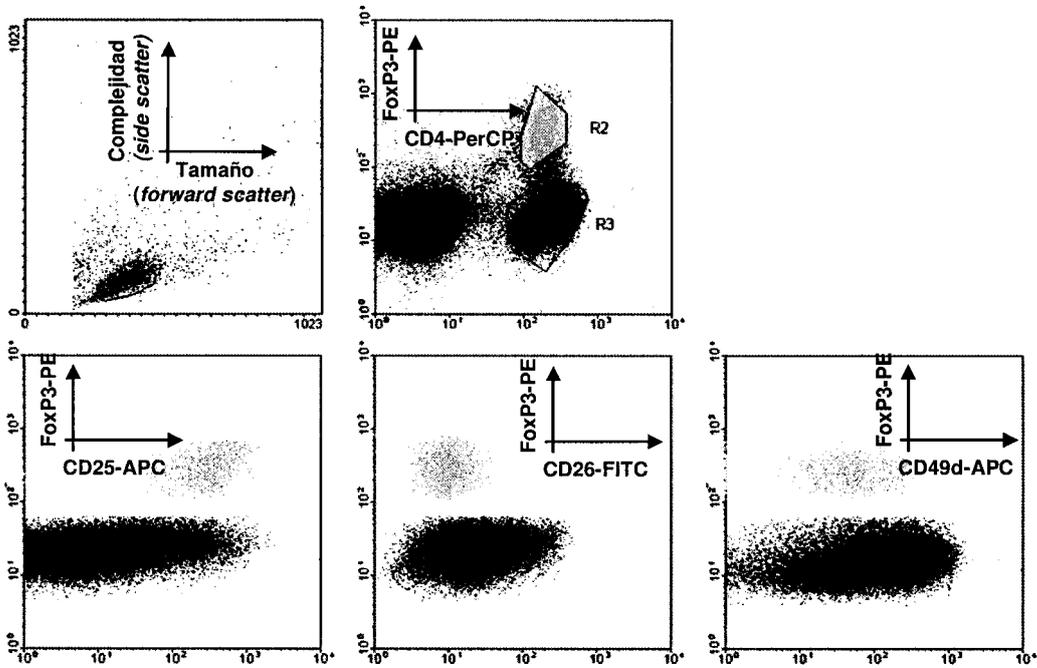


Figura 5A

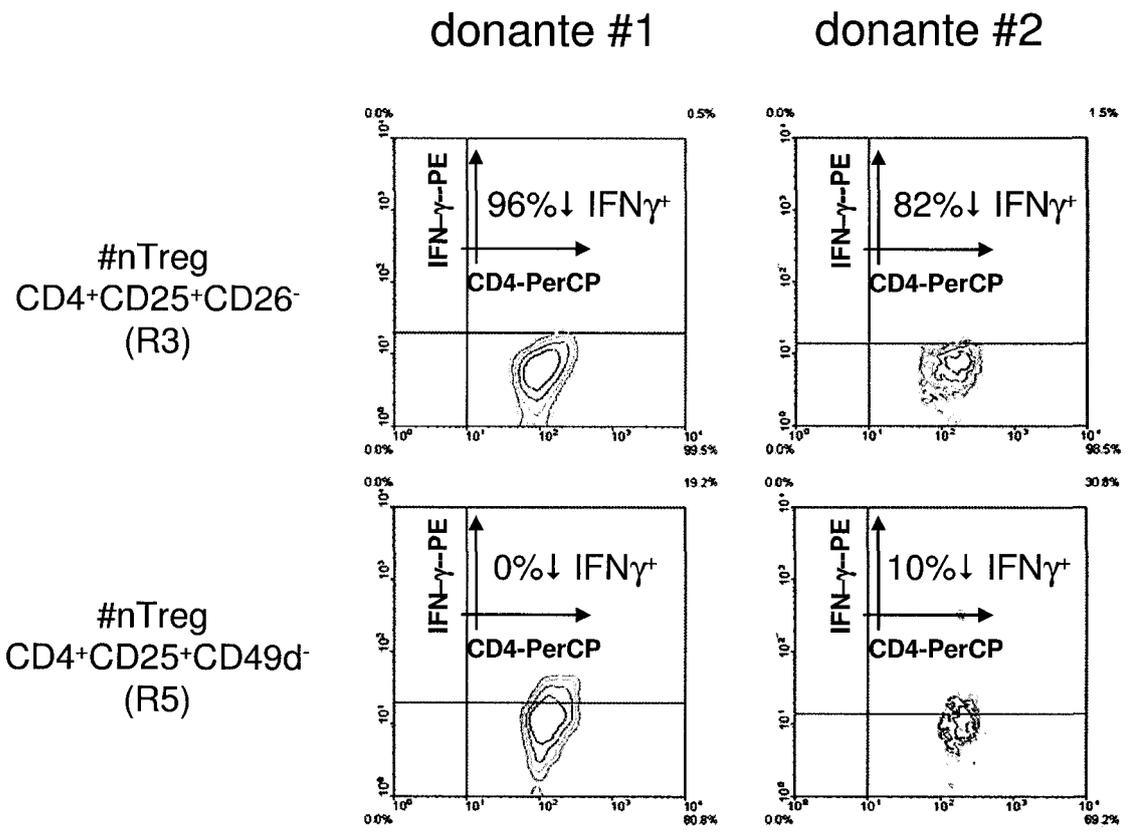


Figura 5B



②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201030096

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 26.01.2010

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MANDAPATHIL M. et al. "Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25 <sup>high</sup> FOXP3 <sup>+</sup> regulatory T cells (Treg)." The Journal of Biological Chemistry. First Published on Octubre 26, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.047423. [recuperado el 14.04.2011] Recuperado de Internet: <URL: <a href="http://www.jbc.org/content/285/10/7176.full.pdf+html">http://www.jbc.org/content/285/10/7176.full.pdf+html</a> >	1,3,6-8,10-11, 14-15,17,19,20-21, 27-28
X	MANDAPATHIL M., LANG S., GORELIK E y WHITESIDE T. L. "Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from peripheral blood based on the CD39 expression." Journal of Immunological Methods (2009) Vol. 346, páginas 55-63.	1-6,10-11,14-15, 17-19,27,54-55
A	KLEINWIETFIELD M., STARKE M., DI MITRI D., BORSELLINO G., BATTISTINI L., RÖTZSCHKE O. y FALK K. "CD49d provides access to "untouched" human Foxp3 <sup>+</sup> Treg free of contaminating effector cells." Blood (2009) Vol. 113, páginas 827-836.	1-55
A	MIROSLAW J., SZCZEPANSKI et al. "Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia." Clinical Cancer Research (2009) Vol. 15, páginas 3325-3332.	1-55
A	HARTIGAN-O'CONNOR D. J. et al. "Human CD4 <sup>+</sup> regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells." Journal of Immunology Methods (2007) Vol. 319, páginas 41-52.	1-55

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
25.04.2011

Examinador  
M. García Bueno

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N5/00** (2006.01)

**C12N5/07** (2010.01)

**C12N5/0783** (2010.01)

**C07K16/28** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.04.2011

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2, 4-5, 9, 12-13, 16-55	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 3, 6-8, 10-11, 14-15	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 9, 12-13, 16, 22-26, 29-53	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8, 10-11, 14-15, 17-21, 27-28 y 54-55	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MANDAPATHIL M. et al. "Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells (Treg)." The Journal of Biological Chemistry. First Published on Octubre 26, 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.047423. [recuperado el 14.04.2011] Recuperado de Internet: <URL: <a href="http://www.jbc.org/content/285/10/7176.full.pdf+html">http://www.jbc.org/content/285/10/7176.full.pdf+html</a> >	26.10.2009
D02	MANDAPATHIL M., LANG S., GORELIK E y WHITESIDE T. L. "Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from peripheral blood based on the CD39 expression." Journal of Immunological Methods (2009) Vol. 346, páginas 55-63.	2009
D03	KLEINWIEFELD M., STARKE M., DI MITRI D., BORSELLINO G., BATTISTINI L., RÖTZSCHKE O. y FALK K. "CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells." Blood (2009) Vol. 113, páginas 827-836.	2009
D04	MIROSLAW J., SZCZEPANSKI et al. "Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia." Clinical Cancer Research (2009) Vol. 15, páginas 3325-3332.	2009
D05	HARTIGAN-O'CONNOR D. J. et al. "Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells." Journal of Immunology Methods (2007) Vol. 319, páginas 41-52.	2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de invención consiste en un método para aislar células nTreg de una muestra biológica que comprende el tratamiento de la muestra biológica con anticuerpo anti-CD25 y con anticuerpo CD-26, y la separación de las células nTreg (reivindicaciones 1-16), el kit para llevar a cabo dicho método (reivindicaciones 17-28), y su uso para aislar células nTreg (reivindicaciones 29-30).

La presente solicitud de invención también consiste en un método para identificar células nTreg en una muestra biológica aislada que comprende las etapas de detección del producto de expresión del gen CD-25 y CD-26, comparar la cantidad de producto expresado de los genes con una cantidad de referencia y asignar dicha comparación a la identificación de las células nTreg, cuando la cantidad de producto de expresión del gen CD-26 detectada es significativamente menor que la cantidad de referencia y la del gen CD-25 es significativamente mayor (reivindicaciones 31-40), el kit para llevar a cabo dicho método (reivindicaciones 41-51) y uso del kit (reivindicaciones 52-53).

Por último, la presente solicitud de invención consiste en un método para purificar células nTreg (reivindicaciones 54-55).

El documento D01 consiste en un estudio sobre la separación de células T reguladoras naturales de una muestra de sangre periférica en donde la presencia de CD39 y la baja expresión de CD26 son responsables de la generación de adenosina, que desempeña un papel importante en la inmunosupresión mediada por células Treg.

El documento D02 consiste en un examen de perfiles fenotípicos de células Treg después de su purificación en la sangre periférica mediante citometría de flujo multiparamétrica.

El documento D03 divulga marcadores que se usan para aislar células Treg entre los que se encuentran CD25, FOXP3, CD49d y CD127. Sin embargo no revela el uso de CD26 como marcado para el aislamiento de las células Treg (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un estudio de la evaluación, fenotipo y características funcionales de las células Treg obtenidas a partir de la circulación periférica de pacientes con leucemia mielogénica aguda (ver todo el documento).

El documento D05 divulga un estudio para identificar los marcadores que son sensibles y específicos para células nTreg humanos, analizando catorce marcadores intracelulares y de la superficie celular de las células CD4+ (ver todo el documento).

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos DVIII, DVII y DIX en que ninguno de los documentos citados muestra el uso de anticuerpos anti-CD26 para el aislamiento, identificación o purificación de las células nTreg. Por lo tanto los documentos D03-D05 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica.

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986).

1.1-Reivindicaciones 1, 3, 6-8, 10-11, 14-15.

El documento D01 divulga un método para aislar células Treg de una muestra de sangre periférica que comprende tratar la muestra con anticuerpos anti-CD25-PC5 y anti-CD26-PE y separar las células nTreg. El documento D01 también divulga el tratamiento de la muestra con anticuerpos anti-CD4-PC5 o anti-CD4-ECD y anti-CD8-PC5, mediante citometría de flujo (ver páginas 2-3).

Las características de las reivindicaciones 1, 3, 6-8, 10-11, 14-15 ya son conocidas del documento D01. Por lo tanto esas características no son nuevas a la vista del estado de la técnica conocido, según el Art. 6.1 LP 11/1986.

1.2-Reivindicaciones 2, 4-5, 9, 12-13, 16-55.

Las reivindicaciones 2, 4-5, 9, 12-13, 16-55 son nuevas a la vista del estado de la técnica según el artículo Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.1- Reivindicaciones 1-6, 10-11, 14-15, 17-21, 27-28 y 54-55.

El documento D02 divulga el uso de los anticuerpos anti-CD25-PC5, anti-CD26-PE y anti-CD4-PC5 o anti-CD4-ECD para la clasificación de la célula (ver apartados 2.4, 2.5 y 3.2).

El documento D02 también divulga que la ausencia o baja expresión de CD127 en las células Treg se utiliza para el aislamiento de células Treg, al igual que la glicoproteína de membrana CD26 (ver páginas 60-61).

A la vista de lo que se conoce del documento D02 no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar un método como el descrito en las reivindicaciones 1-6, 10-11 y 14-15, que comprende las etapas de tratamiento de la muestra biológica con anticuerpo anti-CD25 y con anticuerpo anti-CD26, y la separación de las células nTreg, debido a que el fenotipo de las células nTreg es conocido en el estado de la técnica (CD4+CD25+). Lo mismo ocurre con las reivindicaciones 54 y 55, que reivindican un método para purificar células nTreg que comprende el tratamiento de una población celular CD25+ con anticuerpo anti-CD26, y la selección de células que no expresan CD26 de la población celular utilizada en dicho método.

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-6, 10-11, 14-15 y 54-55 no implican actividad inventiva según el art. 8.1 LP 11/1986.

A la vista de lo que se conoce de los documento D01-D02 no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar un kit como el descrito en las reivindicaciones 17, 19, 20-21, 27 y 28. Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 17, 19, 20-21, 27-28 no implican actividad inventiva según el art. 8.1 LP 11/1986.